

Die Rolle des ERK 1/2 - Signalweges in der Regulation des kontraktilen Apparates und der Permeabilität in Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von Christoph Walter Rodewald
aus Göttingen

Gießen 2008

Aus dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

1. Gutachter : PD Dr. Noll

2. Gutachter : Prof. Dr. Pleschka

Tag der Disputation : 29.01.2009

Gewidmet meinen lieben Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Endothel als Barriere zwischen Blut und Gewebe	1
1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen	3
1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK).....	6
1.4 Fragestellung	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Zellkultur.....	11
2.2 Makromolekülpermeabilität von endothelialen Zellschichten.....	12
2.3 Messung der isometrischen Kraft von endothelialen Zellschichten	13
2.4 Bestimmung der Myosin Leichtketten Phosphorylierung.....	14
2.5 Bestimmung der Phosphorylierung von ERK1/2	16
2.6 Bestimmung der MLCK-Aktivität.....	16
2.7 Phosphorylierung der Myosin-bindenden Untereinheit (MYPT)	17
2.8 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.....	18
2.9 Statistische Analyse	19
2.10 Material	20
3 Ergebnisse	23
3.1 Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Permeabilität	23
3.2 Thrombin aktiviert ERK 1/2-Signalweg.....	26
3.3 Hemmung von MEK 1/2 stabilisiert die endotheliale Schranke	29
3.4 Der Effekt von ERK auf den kontraktile Apparat involviert MLCK	33
4 Diskussion	41

4.1	Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität ist nicht allein durch Unterdrückung des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs hemmbar.....	41
4.2	Einsatz von ERK-Hemmstoffen stabilisiert die endotheliale Barriere	42
4.3	Phosphatasen sind an dem Effekt von ERK1/2 nicht beteiligt.....	43
4.4	ERK aktiviert direkt die MLCK	43
5	Zusammenfassung.....	46
6	Summary	48
7	Literaturverzeichnis	50
8	Anhang.....	58
8.1	Lebenslauf.....	58
8.2	Wissenschaftliche Publikationen	61
8.3	Veröffentlichte Kongressbeiträge	61
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	64

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BisAA	Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DTT	1,4-Dithiothreitol
DMEM	Dulbeccos Modification of Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(-aminoethylether-)tetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
Fura 2	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(-2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
x g	x Erdbeschleunigung
G/V	Gewicht / Volumen
HBSS	Hank's balanced salt solution
HUVEC	humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
I. E.	internationale Einheiten
IP ₃	Inositoltrisphosphat

kg	Kilogramm
M	mol / Liter
MYPT	Myosin-bindende Untereinheit
MG	Molekulargewicht
MLC	Myosinleichtketten
MLC~P	monophosphorylierte MLC
MLC~PP	diphosphorylierte MLC
MLCK	MLC-Kinase
MLCP	MLC-Phosphatase
N	Newton
P	Signifikanzniveau
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
s	Sekunde
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Thrombin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V/V	Volumen / Volumen
Xe C	Xestospongin C
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
% (vol / vol)	Volumenprozent
% (wt / vol)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem kontraktilen Apparat der Endothelzellen und dessen zentraler Rolle im endothelialen Schrankenversagen. Dieses stellt z.B. im septischen Krankheitsgeschehen einen wichtigen pathophysiologischen Mechanismus dar. Es kommt hierbei zu einer erhöhten Ödemneigung, die eine schwere Komplikation darstellt und klinisch nur schlecht beherrschbar ist.

Hier soll insbesondere die Rolle des MEK/ERK-Signalmechanismus bei der Aktivierung des kontraktilen Apparates untersucht werden. Als Modell kommen kultivierte Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen zum Einsatz. Eine Hyperpermeabilität wird durch den prokoagulatorischen und inflammatorischen Mediator Thrombin ausgelöst.

1.1 Das Endothel als Barriere zwischen Blut und Gewebe

Aufgaben des Endothels

Das Endothel stellt die innere Oberfläche aller Blutgefäße des menschlichen Körpers dar. Die Endothelzellen bilden dabei eine einlagige Schicht, deren luminale Seite ständig den dynamischen, metabolischen Änderungen des Blutstroms ausgesetzt ist und somit eine spezielle strategische Position einnimmt (55).

Seit Furchtgott und Zawadski im Jahre 1980 (18) die essentielle Rolle von Endothelzellen bei der Regulation des Gefäßtonus demonstrierten, rückte das Endothel zunehmend in den Blickpunkt kardiovaskulärer Forschung. Es wird seitdem nicht mehr als passive Barriere zwischen Blut und Gewebe angesehen, sondern als äußerst aktives endokrines Organ, dass zentrale Aufgaben in der Regulation und Homöostase des Herz- Kreislaufsystems erfüllt (9). Dazu gehört unter anderem die Regulation des Gefäßtonus und der Blutversorgung der Organe (12, 18, 49). Durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Wandschubspannung, zirkulierende Mediatoren oder Hypoxie, setzt das Endothel vasoaktive Substanzen frei. Diese wirken auf die Gefäßmuskelzellen entweder kontrahierend (Endothelin, Thromboxan A₂,

Prostaglandin H_2) oder relaxierend (NO, EDHF) (12, 44, 61). Dadurch wird unmittelbar der Blutfluss in dem entsprechenden Gefäßabschnitt reguliert. Zudem nehmen Endothelzellen Einfluss auf die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Auf der endothelialen Zellmembran ist das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) lokalisiert, welches Angiotensin I in das aktive Angiotensin II umwandelt (44). Dieses wirkt in den präkapillären Arteriolen stark gefäßverengend.

Das Endothel greift weiterhin regulierend in das Gleichgewicht von Gerinnung und Thrombolyse ein. Es produziert unter anderem den Plättchen-Aktivierenden-Faktor (PAF), von-Willebrand-Faktor, Plasminogen-Aktivator (t-Pa), Thrombomodulin und andere Faktoren, die für die Hämostase von Bedeutung sind (12, 14).

Endothelzellen spielen eine wesentliche Rolle in der Angiogenese. Verschiedene angiogenetische Stimuli, wie z.B. Hypoxie, veranlassen die Endothelzellen in ein O_2 -unterversorgtes Gewebegebiet einzusprossen. Sie formen dort zunächst erste tubuläre Strukturen und schaffen so die Voraussetzung für die Neubildung von Gefäßen (17, 72).

Die endotheliale Schrankenfunktion

Das Endothel bildet eine kontinuierliche semipermeable Membran, die den Austausch von Metaboliten zwischen Blut und Gewebe kontrolliert (43, 57). Für diesen Stoffaustausch stehen prinzipiell verschiedene Transportwege zur Verfügung. Als transzellulären Transport bezeichnet man die Diffusion durch die Zellmembran oder den Transport in Vesikeln. Parazellulär ist der Transport durch die Interzellulärspalten (43, 46, 52, 57). Dabei ist die endotheliale Barriere für verschiedene Stoffe unterschiedlich permeabel. Flüssigkeiten passieren die Barriere entlang eines hydrostatischen Druckgradienten, wogegen gelöste Stoffen entlang eines Konzentrationsgradienten diffundieren. Man unterscheidet lipidlösliche Stoffe (wie z.B. Sauerstoff und andere Gase), die sehr leicht die Zellmembran durchdringen können, sowie kleine und große lipidunlösliche Stoffe. Kleine lipidunlösliche Stoffe sind z.B. Elektrolyte, Glucose und Aminosäuren. Sie können nicht

direkt die Membran passieren, sondern man nimmt an, dass sie durch kleine Poren (*small pore theory*) diffundieren. Das anatomische Korrelat dieser kleinen Poren von ca. 5 nm Durchmesser stellen am ehesten Interzellulärspalten dar. Große lipidunlösliche Moleküle (Makromoleküle, z.B. Albumin) passieren die Membran durch große Poren. Deren Existenz wird aufgrund von funktionellen Analysen am Kapillarendothel gefordert und ihre Struktur ist nur unzureichend beschrieben. Möglich ist die Passage von Makromolekülen durch vesikulären Transport („transcellular channel“) oder durch große Interzellulärspalten, z.B. in der akuten Entzündungsphase (41, 43, 46). Durch inflammatorische Stimuli, wie z.B. lokale Gewebsverletzung und verschiedene Mediatoren (52), wird die Permeabilität der Barriere für Wasser und Proteine gesteigert (43, 57). Dieser pathophysiologische Transportweg entspricht erweiterten Interzellulärspalten. Wesentlich für die Entstehung dieser vergrößerten Zellspalten ist zum Einen die Auflösung der Zellkontakte, sowie zum Anderen eine Kontraktion der Zellen; ausgelöst durch eine Aktivierung des kontraktile Apparates der Endothelzellen.

1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen

Kontraktile Elemente und Zytoskelett

Die im Zusammenhang dieser Untersuchung wesentlichen Elemente des endothelialen Zytoskeletts sind u.a. Aktin und Myosin (54).

Das Aktinzytoskelett bildet ein drei-dimensionales Netz, das den Zellen ihre Form und Stabilität verleiht. Dabei sind die Aktinfilamente über verschiedene Proteine mit der Plasmamembran assoziiert (1). An den Stellen interzellulärer Kontaktstellen (*tight-* oder *adherence junctions*) stellen transmembranäre Occludine bzw. Cadherine Verbindungen zu den Nachbarzellen her, so dass eine Übertragung von Kräften zwischen den Zellen möglich wird. Das Zytoskelett ist wichtig für jede Art der Formveränderung der Zellen; sei es bei der Migration, Phagozytose, Zellteilung oder aber bei der Regulation der Weite der Interzellulärspalten in einem endothelialen Monolayer. Die Voraussetzung für eine aktive Kontraktion der Zellen (wie z.B. in Muskelzellen) ist das Vorhandensein von Aktin und Myosin in ausreichender Menge und sarkomer-ähnlicher Organisation. 1967 beobachteten Majno et al.

(45) morphologische Änderungen an Endothelzellen, die als Hinweis auf eine aktive Kontraktion der Zellen gewertet werden können (Rundung der Zellkerne, nukleäre Falten, Faserbündel im Zytosol). Dass in Endothelzellen ähnliche kontraktile Proteine wie in Muskelzellen vorkommen, wurde erstmals von Becker et al. (2) beschrieben.

Der Kraft generierende Mechanismus bei der Kontraktion beruht auf der Interaktion zwischen Aktin und Myosin („Kreuzbrückenzyklus“)(1). In Endothelzellen ist die Voraussetzung für diesen Prozess die Phosphorylierung der regulatorischen Myosinleichtkette (MLC) des Myosins, deren Phosphorylierungsgrad im wesentlichen von zwei Proteinen geregelt wird. Die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) initiiert durch Phosphorylierung der MLC die Kontraktion. Die Myosinphosphatase (MLCP), die die MLC dephosphoryliert, sorgt dadurch für eine Relaxation der Zelle.

Die Balance zwischen den Aktivitäten der beiden Enzymen bestimmt den Grad der kontraktiven Aktivierung. Unter Ruhebedingungen sind beide Enzyme aktiv, woraus eine basale Phosphorylierung der MLC resultiert. Aus einer Aktivierung der MLCP resultiert eine Netto-Dephosphorylierung der MLC, auch wenn gleichzeitig die MLCK aktiv ist. Ist die MLCP jedoch gehemmt, so ist für den Grad der Phosphorylierung die Aktivität der MLCK von entscheidender Bedeutung.

Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK)

Die MLCK ist eine spezialisierte Kinase, deren einziges bekanntes Substrat die MLC ist (33). Sie kommt sowohl im quergestreiften Muskel als auch in Glattmuskelzellen und Nichtmuskelzellen, wie z.B. Endothelzellen, vor. Dabei werden in unterschiedlichen Zellen verschiedene Isoformen präferentiell exprimiert. Im wesentlichen lassen sich die Isoformen nach dem Molekulargewicht in zwei Gruppen einteilen. Die kleinere Isoform hat 130 kDa und wird überwiegend in Glattmuskelzellen exprimiert. In Endothelzellen ist vornehmlich die größere oder *non-muscle* MLCK nachweisbar. Sie hat ein Molekulargewicht von etwa 206 bis 220 kDa und wird von einigen Autoren auch als endotheliale MLCK bezeichnet (5, 66).

Die Aktivierung der MLCK wird durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration geregelt. Ca^{2+} bildet zusammen mit Calmodulin einen Komplex, der an die Calmodulin-bindende Sequenz der MLCK bindet und diese aktiviert (26). Aufgrund dieser Umstände wird die MLCK auch als Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige MLCK bezeichnet. Zudem wird die Aktivität der MLCK direkt durch Phosphorylierung geregelt. Verschiedene Proteinkinasen (Proteinkinase A, Proteinkinase C, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, p21-aktivierte Proteinkinase) können die MLCK durch Senkung ihrer Ca^{2+} -Empfindlichkeit aktivieren (20, 21, 33, 65). Im Gegensatz dazu konnten verschiedene Phosphorylierungsstellen an der MLCK für Prolin-gerichtete-Kinasen nachgewiesen werden. Phosphorylierung an diesen Stellen, z.B. durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), steigert die Kinaseaktivität (33, 36, 65).

In Endothelzellen spielt die MLCK eine essentielle Rolle bei der Retraktion und Spaltenbildung zwischen benachbarten Zellen (60, 71). Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der MLCK, MLC-Phosphorylierung, Aktinpolymerisierung, Steigerung der isometrischen Kraft sowie einer Umgestaltung des endothelialen Zytoskeletts mit Vergrößerung der interzellulären Spalten (22, 60, 71). Dies führt letztlich zu einem Anstieg der endothelialen Permeabilität.

Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP)

Phosphatasen sind in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorhanden und an vielen Prozessen beteiligt. Die MLCP ist ein Holoenzym, welches sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Endothelzellen exprimieren verschiedene katalytischen Phosphataseuntereinheiten, Phosphatase 1 (PP1), 2A, B und C (27). Die katalytische Untereinheit der MLCP in Endothelzellen wie auch in Glattmuskelzellen ist im wesentlichen PP 1 (27, 28, 69). Die PP 1 hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. Es existieren mehrere Isoformen (α , δ und γ) der katalytischen Untereinheit. In humanen Endothelzellen ist jedoch vornehmlich die δ -Isoform mit dem kontraktilen Apparat assoziiert (64).

Die Myosin-bindende-Untereinheit (*myosin phosphatase targeting subunit*, MYPT) hat ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Sie bindet sowohl an die katalytische Einheit, als auch an das Substrat, Myosin. Durch die Bindung von MYPT an die katalytische Untereinheit PP 1 wird deren Aktivität gesteigert und die räumliche Nähe zum Substrat geschaffen, wodurch die Dephosphorylierung der MLC ermöglicht wird (27, 28). Eine weitere Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 20 kDa. Ihre Funktion ist nicht bekannt (27).

Die Aktivität der MLCP wird durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die katalytische Untereinheit selbst phosphoryliert werden kann, was zu einer Minderung der MLCP-Aktivität führt (27). Zum anderen kann MYPT phosphoryliert werden. Mindestens zwei Phosphorylierungsstellen der MYPT sind bekannt (Threonin 850 und Threonin 696), die das Ziel von unterschiedlichen Kinasen sind (27, 47, 53). Es gibt Hinweise dafür, dass durch Phosphorylierung der MYPT an Threonin 850 durch RhoA/Rho-Kinase eine Dissoziation des MLCP-Enzymkomplexes induziert wird, was zu einer Verminderung der Aktivität führt (4, 63).

In Endothelzellen ist die MLCP wesentlich an der Regulation des kontraktilellen Apparates und Stabilität der Barriere beteiligt. So führt zum Beispiel die pharmakologische Hemmung der PP 1 zu einer vermehrten Phosphorylierung der MLC und einem Anstieg der isometrischen Kraft in humanen Endothelzellen (15, 23, 68). Außerdem kommt es zu einer Veränderung der Zellform mit Bildung interzellulärer Spalten (68). Durch Stimulation mit Thrombin wird die MLCP über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Signalweg gehemmt, was ebenfalls zu einem Anstieg der isometrischen Kraft mit konsekutivem Versagen der Barriere führt (15). Andererseits kann durch Mikroinjektion der konstitutiv aktiven Domäne der Phosphatase 1 die Kontraktion der Endothelzellen verhindert werden (15).

1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Allgemein

MAPK sind eine große Gruppe von Signalmolekülen, die in eukaryotischen Zellen unterschiedlichste Aufgaben erfüllen. Unter anderem sind sie in die

Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Aktivierung der Gentranskription, Proteinsynthese und der Zellmigration involviert (10, 38). Ebenso vielfältig sind die Faktoren, die zu ihrer Aktivierung führen. Sie können durch Hormone, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide, Mitglieder der TGF β -Familie sowie durch inflammatorische Zytokine, osmotischen Schock, ionisierende Strahlung und Ischämie aktiviert werden. In die Signaltransduktion sind unter anderem Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren involviert (10, 38). *Upstream*-Signalelemente sind die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) und MAP-Kinase-Kinase (MEK), die durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert werden (10, 32, 38). Aufgrund unterschiedlicher Aminosäuresequenzen der Aktivierungsstelle werden MAPK in drei Gruppen eingeteilt: die *extracellular-signal-regulated-kinase* (ERK), die c-Jun N-terminus Protein Kinase (JNK) und p38 MAPK. ERK1 und ERK2 werden entsprechend ihrem Molekulargewicht auch p42 bzw. p44-MAPK genannt und stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit (6, 32, 38).

Die p38 MAPK und JNK sind Stress-aktivierte Kinasen, die vor allem durch inflammatorische Zytokine und verschiedene physikalische und chemische Stressoren aktiviert werden. ERK 1/2 werden z.B. durch Mitogene und Phorbolester aktiviert und modulieren die Genexpression über verschiedene Transkriptionsfaktoren (6, 10, 38). Neben diesen eher langandauernden Prozessen sind ERK 1/2 jedoch auch an akuten Prozessen wie z.B. der Inflammation beteiligt (7, 37). Dabei kommt es unter anderem zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und Änderung der Zellform, Prozesse, die bei der Zellmigration oder der Regulation der endothelialen Barriere von Bedeutung sind (6, 29, 37).

ERK und Zytoskelett

In Karzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass für die Zellmigration die Aktivierung von ERK notwendig ist (11). Die Überexpression von konstitutiv aktiven MEK führt in diesen Zellen zu einer Steigerung der Aktin/Myosin-Kolokalisation und Zunahme der MLC-Phosphorylierung. Durch pharmakologische Hemmung von ERK lässt sich eine kontraktile Aktivierung

verhindern (11). Darüber hinaus ist eine ERK-Aktivierung in COS-7-Zellen und Fibroblasten aus Rattenembryonen für eine gesteigerte Aktivität der MLCK verantwortlich (16, 36). Abhängig von diesen Mechanismen bilden die Zellen Pseudopodien, worüber eine Chemotaxis und Migration ermöglicht wird (8).

Auch in Glattmuskelzellen ist ein Zusammenhang von ERK-Aktivierung, Reorganisation des Zytoskeletts und Kraftentwicklung beschrieben worden. In Koronararterien des Rindes lässt sich durch Dehnung eine ERK-Phosphorylierung auslösen, die mit einer Steigerung der Kraftgeneration einhergeht (48). Stimulation mit Endothelin führt in Carotisarterien vom Schwein ebenfalls zu einer Steigerung der ERK-Aktivität mit Anstieg der isometrischen Kraft (13). Sobue und Sellers (56) konnten in Glattmuskelzellen eine Phosphorylierung von Caldesmon durch ERK nachweisen und damit einen möglichen Mechanismus für die ERK-vermittelten Regulation der Kraftentwicklung aufzeigen. Caldesmon ist ein Protein, dass durch Bindung an Aktin die Assoziation mit Myosin und damit eine Kontraktion verhindert. Durch Phosphorylierung verliert es seine Bindung an Aktin, so dass eine Kontraktion nun ermöglicht wird (42).

ERK in Endothelzellen

Auch in der Funktion von Endothelzellen spielt der ERK-Signalweg eine bedeutende Rolle. Es ist in aortalen Endothelzellen vom Rind gezeigt worden, dass Scherstress ERK über einen Tyrosinkinase- und G-Protein-abhängigen Schritt aktiviert (31, 58). Bei diesem über mehrere Stunden bis Tage andauernden Prozess werden das Zytoskelett und die Zelladhäsionsstrukturen in komplexer Weise umgebaut (30, 31).

Aber auch eher akute Ereignisse werden mit einer ERK-Aktivierung in Zusammenhang gebracht. So ist beispielsweise die durch VEGF induzierte Hyperpermeabilität, die in einem Zeitraum von etwa zehn bis vierzig Minuten einsetzt, durch spezifische Inhibitoren von ERK hemmbar (35, 40). Varma et al. (62) zeigten, dass die Hemmung von ERK sowohl in unstimulierten Zellen die Permeabilität reduziert als auch eine cGMP-induzierte Zunahme der

Permeabilität verhindern kann. Weitere Faktoren, die zu einer gesteigerten Aktivierung von ERK und konsekutiver Störung der endothelialen Barriere führen, sind reaktive Sauerstoffspezies (34), Phorbol ester (67), Thrombin (7), Histamin (70) und die Dissoziation von Mikrotubuli (3). Mit der gestörten Funktion geht eine Umverteilung von Zelladhäsionsproteinen (Occludin, VE-Cadherin) einher, die durch Hemmung von ERK verhindert werden kann (35). Nach Stimulation mit Thrombin kommt es neben dem ERK-abhängigen Umbau des Aktinzytoskeletts noch zu einer vermehrten Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen des kontraktile Apparates, wie z.B. Caldesmon (7). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von Caldesmon die Interaktion von Aktin und Myosin erleichtert, und damit die kontraktile Aktivierung der Endothelzellen steigert. Eine direkte Aktivierung des kontraktile Apparates über die MLCK mit Steigerung der isometrischen Kraft ist jedoch in Endothelzellen bisher nicht gezeigt worden.

1.4 Fragestellung

Das Krankheitsbild der Sepsis geht mit einem generalisierten inflammatorischen Geschehen einher. Mediatoren, wie z.B. Thrombin, verursachen dabei ein *capillary leakage syndrome*, dass klinisch schwer zu beherrschen ist, und dessen Pathomechanismen nicht hinreichend geklärt sind. Eine wesentliche Ursache scheint eine Aktivierung des kontraktile Apparates von Endothelzellen zu sein, die mit einem Versagen der endothelialen Schranke einhergeht.

Es ist bekannt, dass Thrombin einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auslöst, die eine Kontraktion des Zytoskeletts mit Steigerung der Permeabilität verursacht. Pilotexperimente zeigten jedoch, dass sich diese Hyperpermeabilität allein durch Hemmung des Ca^{2+} -Anstiegs nicht verhindern ließ. Möglicherweise gibt es also Faktoren, die unabhängig von einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration den kontraktile Apparat beeinflussen.

Weiterhin sind Mechanismen bekannt, die über eine Hemmung der MLCP eine Aktivierung des kontraktile Apparates verursachen (15). Unter der Bedingung, unter der die MLCP gehemmt ist, bestimmt allein die Aktivität der MLCK den Grad der kontraktile Aktivierung. Faktoren, die unter diesen

Umständen Einfluss auf die Aktivität der MLCK nehmen sind nur unzureichend untersucht. Arbeiten aus der eigenen Gruppe (37) zeigten zudem, dass ERK Einfluss auf die Phosphorylierung der MLC nehmen können.

Diese Überlegungen und Befunde führten zu der Frage, ob eine Aktivierung des ERK-Signalweges im inflammatorischen Geschehen Ca^{2+} -unabhängig die MLCK aktiviert und so die Funktion der endothelialen Barriere stört. Thrombin wurde dazu als Modellschranke eingesetzt. Insbesondere sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wird das Thrombin-induzierte Schrankenversagen über ERK vermittelt?
2. Welche Bedeutung hat in diesem Zusammenhang die Aktivierung von ERK für die Funktion der endothelialen Barriere?
3. Kann durch Hemmung des ERK 1/2- Signalweges der kontraktile Apparat gehemmt und somit die isometrische Kraft und die Permeabilität gesenkt werden?
4. Wirkt die ERK-Aktivierung über die MLCP oder über die MLCK auf den kontraktile Apparat?
5. Ist eine direkte Aktivierung der MLCK durch ERK 1/2 möglich?

Die Klärung dieser Fragen soll zum Verständnis der Mechanismen beitragen, die ursächlich sind für das Versagen der endothelialen Schranke und Ödembildung im inflammatorischen Krankheitsgeschehen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Präparation und Kultivierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Die Nabelschnüre wurden von der Universitätsfrauenklinik Giessen zur Verfügung gestellt. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung maximal 24h in einem sterilen Plastikgefäß bei 4°C aufbewahrt.

Die Präparation der Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurde nach der Methode von Peters et al. durchgeführt (51). Nur ausreichend lange und intakte Abschnitte der Nabelschnur wurden ausgewählt um Zellen zu gewinnen. Zunächst wurde die Nabelschnur mit einer Kompresse äußerlich gereinigt. An jedem Ende wurde die Vena umbilicalis dargestellt. In sie wurde eine Knopfkanüle eingeführt und mit Kabelbindern fixiert. An jedes Ende wurde ein Dreiwegehahn angeschlossen. Nun wurde die Nabelschnurvene solange mit HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, s.u.) gespült, bis das Lumen frei von Rückständen war. Um die Endothelzellen von der Gefäßwand zu lösen wurde nun Collagenase D in 0,025-prozentiger Enzymlösung (Boehringer Mannheim) infundiert und die beiden Dreiwegehähne verschlossen. Anschließend wurde die Nabelschnur für 20 Minuten im Brutschrank gelagert. Um den Lösungsprozess der Endothelzellen zu unterstützen, wurden die Nabelschnur leicht geknetet und dann der Inhalt in einem 50 ml Gefäß aufgefangen. Die Nabelschnurvene wurde nun nochmals mit HBSS und 3% FCS gespült um die Collagenase zu inaktivieren. Das Effluat wurde bei 800 xg für fünf Minuten zentrifugiert und das gewonnene Pellet in Kulturmedium (Endothelial Cell Basal Medium, Promocell, Heidelberg versetzt mit 1 µg/ml Hydrocortison, 0,1 ng/ml EGF, 1 ng/ml bFGF, 10 % FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Schließlich wurde die Suspension auf Primaria-Kulturschalen ausgesät und etwa sechs Tage bis zur Konfluenz im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Identifikation der Zellen

Die Identifikation der Endothelzellen erfolgte anhand der typischen Pflasterstein-Morphologie und Nachweis des von Willebrand Faktors mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (anti-vWF Antikörper; Dakopatts, Hamburg). Als Zweitantikörper diente ein an FITC gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg).

2.2 Makromolekülpermeabilität von endothelialen Zellschichten

Die Permeabilität von endothelialen Zellschichten wurde in einem Zweikammer-System bestimmt. Das luminale und abluminale Kompartiment wurde durch eine poröse Filtermembran getrennt, auf der die Endothelzellen bis zur Konfluenz kultiviert wurden. In beiden Kompartimenten befand sich als Basismedium eine modifizierte Tyrode-Lösung (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , und 30 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37°C) ergänzt durch 2% (V/V) hitzeinaktiviertes NCS (10 Minuten bei 65°C). Das luminale Kompartiment hatte ein Volumen von 2,5 ml, das abluminale eines von 9,5 ml, wobei das abluminale mittels Magnetrührfisch ständig durchmischt wurde. Zwischen beiden Kompartimenten bestand keine hydrostatische Druckdifferenz.

In das luminale Kompartiment wurde zusätzlich mit Trypanblau markiertes Albumin gegeben (60 μM). Die Diffusion des Trypanblau-markierten Albumins durch den Endothelzellmonolayer und die Filtermembran wurde im abluminalen Kompartiment mittels Spectrophotometer (Specord 10, Zeiss Jena, Deutschland) kontinuierlich gemessen. Dazu wurde ein Teil des abluminalen Kompartiments rezirkulierend über eine Durchflußküvette des Photometers gepumpt. Die Konzentration des Albumins im luminalen Kompartiment wurde alle 10 min bestimmt und blieb während eines Experiments nahezu konstant.

Der Albuminfluß (F , $\text{mol}/(\text{sek} \times \text{cm}^2)$) durch die Endothelzellschicht mit der Fläche (S) wurde bestimmt durch den Anstieg der Albuminkonzentration

(d[A]₂) während des Zeitintervalls (dt) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen (V):

$$F = \frac{d[A]_2/dt \times V}{S} \quad (I)$$

Der Permeabilitätskoeffizient (P, [cm/s]) der Kombination aus Zellmonolayer und Filtermembran wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{([A]_1 - [A]_2)} \quad (II)$$

wobei [A]₁ und [A]₂ die Albuminkonzentrationen im luminalen und abluminalen Kompartiment darstellen. Da die treibende Kraft ([A]₁ – [A]₂) im Laufe des Experimentes praktisch konstant blieb, entsprechen die relativen Veränderungen von F denen des Permeabilitätskoeffizienten (P).

2.3 Messung der isometrischen Kraft von endothelialen Zellschichten

Die Entwicklung isometrischer Kräfte von Endothelzellen wurde in einer speziellen Apparatur gemessen. Dazu wurden Endothelzellen auf Kollagen-Gelen kultiviert, die in der Messapparatur mit einem Kraftwandler (KG 7A mit Doppelbrückenverstärker DUBAM 7C, Scientific Instruments GmbH, Heidelberg) verbunden waren.

Die Kollagen-Gele (17 x 22 x 4 mm) wurden in eine spezielle Form aus Sylgard-Silikon gegossen (Sylgard 186 silicone elastomer, Dow Corning Corp., Midland, USA). Dazu wurde 4 ml Rattenschwanzkollagen (First Link, Brierly Hill, UK) mit 0,6 ml eines 10-fach konzentrierten DMEM und 0,6 ml FCS vermischt. Es wurden ca. 200 µl 1M NaOH zugegeben bis ein Farbumschlag des Mediums von Gelb nach Pink erfolgte. Dadurch

polymerisierte das Kollagen und die Mischung verfestigte sich. 580 µl des Kollagen-Gels wurden nun in die Silikon-Form zwischen zwei Polyethylen-Halter (18 x 5 x 3 mm) gegossen an denen das Gel adhärierte. Zur vollständigen Auspolymerisierung wurden die Gele für 5 min. in einen Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach wurden 2,5 ml einer Suspension von Endothelzellen (ca. 300 000) in Kulturmedium (PromoCell, s.o.) aufgebracht und die Zellen zwei Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Damit das Gel nicht vorzeitig aufschwamm, wurde es mit Polyethylen-Keilen am Boden fixiert.

Zu Beginn eines Experiments wurde die Silikon-Formen mit den Gelen und den Zellen in die Messapparatur eingebracht. Mit Mikromanipulatoren (Märzhäuser, Wetzlar) wurde auf der einen Seite in den Polyethylen-Halter ein Fixierungsstift und auf der anderen Seite ein Kraftwandler eingeführt. Die Fixierungskeile der Polyethylen-Halter wurden nun entfernt, so dass das Gel aufschwamm. Durch die schwimmende Position des Gels mit den Zellen wurde eine Beeinträchtigung der Messung durch Reibungskräfte verhindert. Zudem befanden sich die Gele in einer Inkubationskammer mit konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂, 95% O₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit). Die Messapparatur befand sich auf einem Vibrationsentkoppelten Tisch.

Nach einer Äquilibrationsphase von etwa zwei Stunden war die Kraftentwicklung der Endothelzellschichten konstant und das Experiment wurde gestartet. Nach jedem Experiment wurde 3 µM Cytochalasin D hinzugegeben. Dieses Agens zerstört das Aktinzytoskelett der Zelle und führt so zu einem vollständigen Verlust der durch die Endothelzellen aufgebauten Kraft. Somit konnte zwischen einer tatsächlich durch die Zellen generierten Kraft und einer eventuellen entwickelten Grundspannung durch die Kollagen-Gele unterschieden werden. Zellfreie Kollagen-Gele zeigten keinerlei Kraftentwicklung.

2.4 Bestimmung der Myosin Leichtketten Phosphorylierung

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der regulatorischen Myosinleichte (MLC) wurden die nicht-phosphorylierte Isoform sowie die mono- und diphosphorylierte Isoform elektrophoretisch voneinander getrennt.

Die Methode unter Verwendung von Harnstoff-Gelen geht auf Persechini (50) zurück.

Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz auf 3 cm Kulturschalen kultiviert und in einem Inkubationsmedium (HBSS, 1,25 mM CaCl₂) mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. Danach wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Reaktion mit eiskalter Trichloressigsäure (1,2 mM) gestoppt. Das präzipitierte Protein wurde mit einem Schaber vom Boden gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 40 000 xg, 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zwei Mal mit Diethylether resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5 min bei 40 000 xg, 4°C). Nachdem der Ether vollständig verdampft war, wurden die Präzipitate in 30 µl Lysispuffer (8,8 M Harnstoff; 10 mM DTT; 5 mM Thioglykolat; 0,6 mM PMSF; 10 µM Cantharidin; 60 mM Imidazol; 20 mM Tris; 23 mM Glyzin; pH 8,8; 37°C) aufgenommen. Nach Zugabe von 3 µl einer gesättigten Saccharose-Bromphenolblau-Lösung wurden 7 µl der Probe auf ein Glycerol-Harnstoff-Gel (20,7 ml Glycerol; 11,25 ml Acrylamid; 9,5 ml BisAcrylamid; 3,8 ml Tris/Glycin-Puffer) aufgetragen.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 400 V für 75 Minuten, wobei die hohe Spannung eine kontinuierliche Kühlung der Gele erforderlich machte. Anschließend wurden die Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen MLC inkubiert (Klon MY-21, Sigma, Deisenhofen). Mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Zweit-Antikörper wurden die Banden sichtbar gemacht, eingescannt und mittels Densitometrie ausgewertet.

Der Anteil der nicht, mono- (MLC~P) und diphosphorylierter (MLC~PP) MLC (ausgedrückt als % der Gesamt-MLC) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{MLC-Phosphorylierung} = \frac{(2 \times \text{MLC~PP}) + \text{MLC~P}}{\text{Gesamt-MLC}} \times 100$$

Da die MLC zweifach phosphoryliert werden kann, variiert die MLC-Phosphorylierung zwischen 0 und 200%. Die Methode misst das Verhältnis

von nicht phosphorylierter zu phosphorylierter MLC in Bezug zur Gesamt-MLC und ist daher unabhängig von der aufgetragenen Proteinmenge.

2.5 Bestimmung der Phosphorylierung von ERK1/2

Die Zellen wurden wie angegeben inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen in 300 µl Lämmli-puffer (50 mM Tris/HCl; 2% (wt/vol) SDS; 2% (vol/vol) Mercaptopropandiol; 1% (vol/vol) Natriumorthovanadat) lysiert. Zusätzlich wurden 5 U/ml Benzonase in 200 mM MgSO₄ und 30 µl einer Bromphenolblau-Glycerin-Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 7 Minuten bei 65°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Phosphorylierung von ERK1/2 wurden 30 µl des Lysats auf ein 10%iges SDS- Gel (Acrylamid/BisAcrylamid 30:1) aufgetragen und die Proteine über Nacht bei 40 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit einem Antikörper gegen ERK1/2 (Gesamtprotein; Anti-ERK1/2, Kaninchen, polyclonal, Calbiochem, Schwalbach) und gegen phosphoryliertes ERK1/2 (P~ERK1/2, Anti-phospho-ERK1/2, Maus, monoklonal, Calbiochem, Schwalbach) wurde das Protein detektiert und mittels eines an *Horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelten Zweit-Antikörpers (Anti-Maus-IgM/ Anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt; Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen) und Chemilumineszenz (ECL, Amersham) sichtbar gemacht. Die Banden wurden densitometrisch (Quantity One software, Bio-Rad) ausgewertet.

2.6 Bestimmung der MLCK-Aktivität

Für die Messung der MLCK-Aktivität wurden konfluente Endothelzell-Monolayer auf 6 cm-Kulturschalen verwendet. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 37°C mit ML-7 (1-100 µM) und den angegebenen Substanzen inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,3 ml NP-40- Lysispuffers (5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM β-Glycerophosphat, 5 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerol, 0,5% (v/v) NP-40, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1 µg/ml Proteinaseinhibitor (Complete, Roche)) für 10 Minuten auf Eis

inkubiert. Die Lysate wurden fünf mal durch eine 30G-Nadel gezogen. Danach wurden die Lysate für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Für die Messung der Kinase-Aktivität wurden die Lysate für 20 Minuten bei 30°C in 50 µl Assay-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,4, 5 mM β -Glycerophosphat, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $CaCl_2$, 10 µM Cantharidin, 20 mM NaF, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF) inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 µCi [γ - ^{32}P]-ATP gestartet. Als Substrat wurde bovine muskuläre Myosin-Leichtkette (Sigma) verwendet. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten gestoppt, indem Aliquots auf 2,5 x 2,5 cm große Quadrate aus P-81 Whatman-Filterpapier transferiert wurden. Das Filterpapier wurde mit 0,75%iger Phosphorsäure gespült und anschließend 5-mal damit gewaschen. Danach wurden die Quadrate mit Azeton gespült und getrocknet.

Die Aktivität der Filterpapier-Quadrate wurde in einem Szintillations Counter gemessen. Die spezifische MLCK-Aktivität wurde ermittelt, indem von der gesamten Kinase-Aktivität diejenige subtrahiert wurde, die sensitiv für spezifische Inhibition mit MLCK-Pseudosubstrat (100 µM, Biomol) oder ML-7 (5 µM und 100 µM), einem pharmakologischen MLCK-Hemmstoff, war.

2.7 Phosphorylierung der Myosin-bindenden Untereinheit (MYPT)

Die Phosphorylierung von MYPT wurde mit phospho-spezifischen Antikörpern analysiert, die gegen zwei zentrale Phosphorylierungsstellen des Proteins gerichtet sind; Threonin 696 und 850.

Zellen wurden auf 3 cm-Schalen subkonfluent kultiviert. Die Stimulation mit den genannten Substanzen wurde auf einem Heizblock bei 37°C durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch im Wasserbad vorgewärmtes Stimulationsmedium (HBSS+1,25 mM $CaCl_2$) ersetzt und für den angegebenen Zeitraum inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 65°C warmen Lysipuffer (2x Lämmli-puffer (s.o.) + 100 mM Natriumfluorid aufgenommen, mit 5 U/ml Benzoylarginin-Naphthylamid in 200 mM $MgSO_4$ versetzt und in ein 1,5 ml

Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für fünf Minuten auf dem Heizblock bei 90°C inkubiert und homogenisiert.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte über ein 10%iges SDS-Gel bei 40 V über Nacht und weitere zwei Stunden bei 200 V. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form von MYPT-Threonin-850 und -Threonin-696 (Upstate Biotechnologies) inkubiert. Mit einem an *Horseradish*-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (Upstate Biotechnologies) und Chemilumineszenz (ECL, Amersham) wurden die Banden detektiert und densitometrisch ausgewertet.

2.8 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Endothelzellen wurden auf runden Deckgläschen (Durchmesser 2,5 cm) kultiviert. Zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde Fura-2/AM (Azetoxymethylester von Fura-2) verwendet. Fura-2/AM ist zellpermeabel und wird intrazellulär von Esterasen in Fura-2 überführt, welches die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Fura-2 zeigt eine von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) abhängige Fluoreszenz.

Zur Fura-2-Beladung wurden die Zellen zunächst für 45 Minuten in Gegenwart von 5 μM Fura-2 unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde das extrazelluläre Fura-2 durch Medienwechsel entfernt und die Inkubation für 20 min in Kulturmedium (M199 mit 2% (v/v) FCS) fortgesetzt. Das Deckgläschen mit den sich darauf befindenden Zellen wurde dann in eine Inkubationskammer montiert und die Messung mit einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70; Olympus, Hamburg, Deutschland) gestartet. Die Wellenlänge des Lichts zur Fura-2-Anregung wechselte zwischen 340 nm und 380 nm (Bandbreite 2 nm). Das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm (Bandbreite 5 nm) gemessen. Mit Hilfe eines Imaging Systems (TILL Photonic Imaging Systems, T.I.L.L. Photonics GmbH, Martinsried, Deutschland) wurden alle 6 Sekunden ein Videobild der Zellfluoreszenz aufgenommen und nach Abschluss des Experiments analysiert. Um absolute Werte für die Ca^{2+} -Konzentration zu erhalten wurde die Fura-2-Fluoreszenz nach der Methode von Grynkiewicz (24) kalibriert.

Dazu wurden die Zellen mit einem Ca^{2+} -haltigen Kalibrierungsmedium (modifizierte Tyrode-Lösung, 3 mM CaCl_2) inkubiert, um die maximale Fluoreszenz (R_{max}) zu bestimmen. Um die minimale Fluoreszenz (R_{min}) zu bestimmen wurden die Zellen in Ca^{2+} -freien Medium inkubiert, das 5 mM EGTA enthielt. Diese Proben wurden jeweils mit 5 μM Ionomycin behandelt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde unter Verwendung von K_d , der Dissoziationskonstante von Fura 2, und β , dem Verhältnis des 380 nm-Exzitationssignals der Ionomycin-behandelten Zellen bei 5 mM EGTA und 3 mM Ca^{2+} nach folgender Gleichung berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$$

2.9 Statistische Analyse

Angegeben sind der Mittelwert \pm S.D. von bis zu $n = 6$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt nach ANOVA in Verbindung mit dem Bonferoni-Test für post-hoc-Analyse. Wahrscheinlichkeitswerte (P) von $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

2.10 Material

Endothelial Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg
Endothelial Cell Basal Medium	Promocell, Heidelberg
Hanks Balanced Salt Solution	Promocell, Heidelberg
Falcon Primaria-Kulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kollagenase	Böhringer, Mannheim
Medium 199, Penicillin-Streptomycin	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA, FCS, NCS	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Xestospongin C	Calbiochem, Schwalbach
Y-27632	Biotrend, Köln
humanes Thrombin	Aventis Behring, Marburg
UO 126/124	Calbiochem, Schwalbach
Calyculin A	Calbiochem, Schwalbach
ML-7	Calbiochem, Schwalbach
Fura-2/AM	Molecular Probes, Leiden
Phalloidin-TRITC	Sigma, Deisenhofen
Anti-MLC-Antikörper (clone MY-21)	Sigma, Deisenhofen
Anti-vWF-Antikörper	Dakopats, Hamburg
FITC Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG (AP gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Anti-ERK2 (C14)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-ERK1/2 Kaninchen, polyclonal	Calbiochem, Schwalbach
Anti-phospho-ERK 1/2	Calbiochem, Schwalbach
Anti-phospho MYPT (Threonin 850)	Upstate Biotechnologies, Waltham, USA
Anti-phospho MYPT (Threonin 696)	Upstate Biotechnologies, Waltham, USA
Anti-Kaninchen-IgG (HRP)	Upstate Biotechnologies, Waltham, USA
Chemilumineszenz ECL	Amersham, Freiburg
PVDF/Nitrozellulose-Membran	Millipore, Eschborn
Proteinaseinhibitor Complete ^R	Roche, Mannheim
PMSF, DTT, Thioglykolat	Sigma, Deisenhofen
Transwell Polycarbonatfiltereinsätze	Costar, Bodenheim
Rattenschwanz-Kollagen	First Link , Brierley Hill, UK
Sylgard 186 silicone elastomer	Dow Corning Corp., Midland,USA
Spectrophotometer Specord 10	Zeiss Jena, Deutschland
Mikromanipulatoren	Märzhäuser, Wetzlar
Kraftwandler KG 7A	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Doppelbrückenverstärker DUBAM 7C	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
TILL Photonic Imaging Systems	T.I.L.L. Photonics GmbH, Martinsried

Alle weiteren Chemikalien und Biochemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den üblichen Herstellern in höchst möglicher Reinheit bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden gemäß Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Permeabilität

Es ist bekannt (59), dass Thrombin die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum induziert und dadurch eine Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels auslöst. Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration verursacht eine Störung der endothelialen Barrierenfunktion. An dieser Störung ist maßgeblich die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen MLCK und der daraus resultierenden Aktivierung des kontraktile Apparates beteiligt. Eine Erhöhung der isometrischen Kraft und eine Hyperpermeabilität sind letztlich die Folge (22).

Xestospongin C verhindert die Ca^{2+} -Freisetzung durch Thrombin

Um den Zusammenhang zwischen der Thrombin-induzierten Steigerung, der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Hyperpermeabilität zu untersuchen, wurde Xestospongin C verwendet. Xestospongin C verhindert die IP_3 -sensitive- Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, beeinflusst jedoch nicht die basale Ca^{2+} -Konzentration. Mit der oben beschriebenen Methode wurde unter Verwendung von Fura-2 die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Die Stimulation der humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen mit 0,2 U/ml Thrombin verursachte einen transienten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration von ca. 65 nM unter Kontrollbedingungen auf etwa 660 nM. Durch Vorinkubation der Zellen mit 10 μM Xestospongin C ließ sich dieser Ca^{2+} -Anstieg fast vollständig unterdrücken. Die Ca^{2+} -Konzentration stieg nach Stimulation lediglich auf etwa 184 nM an.

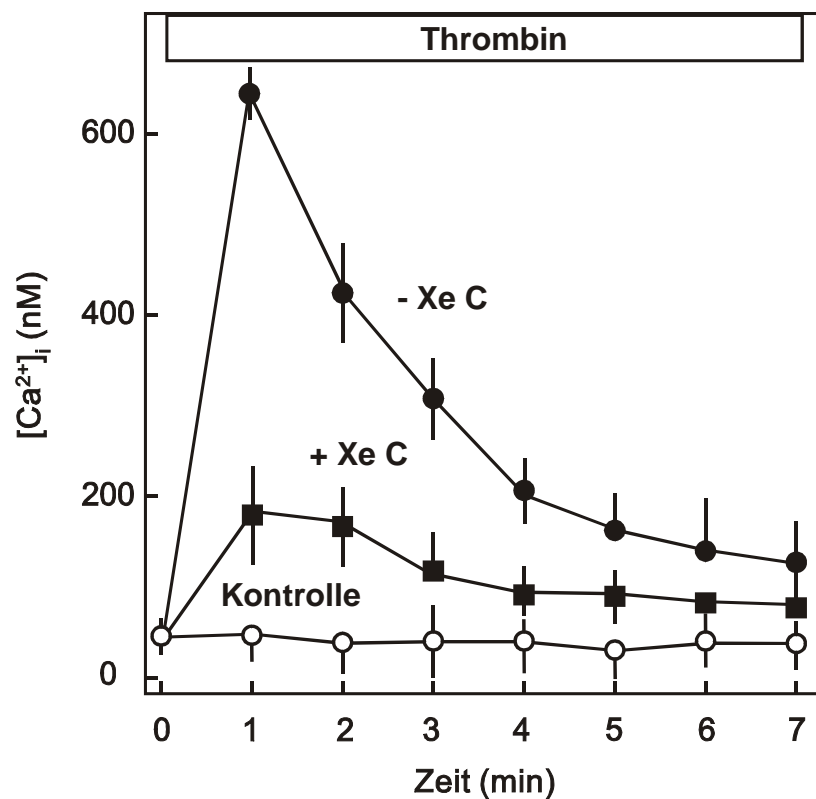


Abb. 1: Wirkung von Xestospongin C (Xe C), einem Hemmstoff des IP_3 -empfindlichen Ca^{2+} -Freisetzungskanal des endoplasmatischen Retikulums, auf die Thrombin-induzierte Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert (- Xe C). Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit 10 μ M Xe C vorinkubiert (+ Xe C), als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; zu den Zeitpunkten zwischen 1 und 4 Minuten ist die Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von Thrombin und Thrombin plus Xe C signifikant verschieden ($P<0,05$).

Die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität lässt sich durch Xestospongin C nicht vollständig verhindern

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die durch Thrombin induzierte Hyperpermeabilität durch Unterdrückung des Ca^{2+} -Anstiegs verhindert wird. Stimulation von HUVEC mit 0,2 U/ml Thrombin führte zu einem Anstieg der Permeabilität von ca. 3×10^{-6} cm/s unter Kontrollbedingungen auf etwa

13 x 10⁻⁶ cm/s. Durch Vorinkubation der Zellen mit 10 µM Xestospongin C ließ sich die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität nur um etwa ein Drittel auf etwa 9 x 10⁻⁶ cm/s reduzieren.

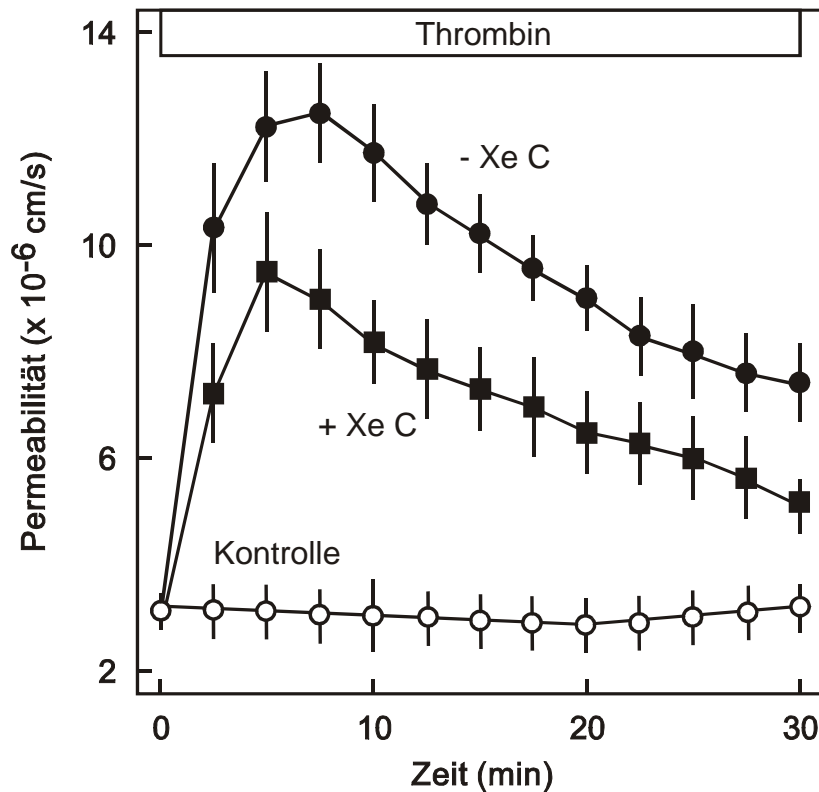


Abb. 2: Wirkung von Xestospongin C (Xe C) auf die Thrombin-induzierte Steigerung der Makromolekülpermeabilität. HUVEC wurden mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert (- Xe C). Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit 10 µM Xe C vorinkubiert (+ Xe C), als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Mittelwerte \pm S.D.; n=5 Experimente unabhängiger Zellpreparationen; zu den Zeitpunkten zwischen 2,5 und 30 Minuten ist die Permeabilität in Gegenwart von Thrombin und Thrombin plus Xe C signifikant verschieden ($P < 0,05$).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass außer der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration noch andere Faktoren Einfluss auf die durch Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität nehmen.

Im Kontext dieser Arbeit steht die Frage im Vordergrund, ob Thrombin die MLCK über einen anderen, nicht Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Mechanismus aktivieren kann. Da es aus Arbeiten der eigenen Gruppe (37) Hinweise gibt, dass ERK 1/2 bei der Phosphorylierung der MLC eine Rolle spielen, wurde im Folgenden untersucht, ob Thrombin die ERK 1/2 aktiviert und ob diese Aktivierung Einfluss auf die Funktion der endothelialen Barriere nimmt.

3.2 Thrombin aktiviert ERK 1/2-Signalweg

Thrombin- induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung

Mit einem phospho-spezifischem Antikörper gegen ERK 1 und 2 wurde die Aktivierung des ERK-Signalweges untersucht. In dem abgebildeten repräsentativen Westernblot (Abb. 3) wird deutlich, dass beide ERK-Isoformen ko-aktiviert werden, so dass im folgenden stellvertretend nur die ERK 2-Isoform untersucht wurde.

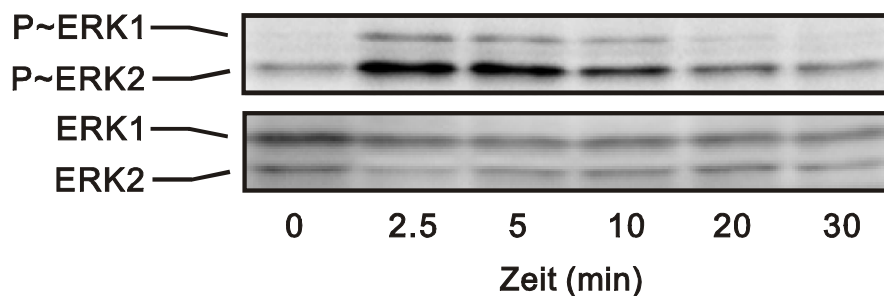


Abb. 3: Wirkung von Thrombin auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 in HUVEC. Der repräsentative Westernblot zeigt die Trennung von phosphoryliertem ERK 1 (P~ERK 1) und phosphoryliertem ERK 2 (P~ERK 2) sowie die Koregulation von ERK 1 und ERK 2 nach Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin für 2.5, 5, 10, 20 und 30 Minuten.

Nach Gabe von 0,2 U/ml Thrombin war im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine ca. zehnfach stärkere Phosphorylierung von ERK 2 nachweisbar. Im Zeitverlauf war das Maximum der Phosphorylierung bereits nach 2,5 min feststellbar, während nach 10 min die Phosphorylierung wieder zurückging und nach 20 min fast wieder das Kontrollniveau erreichte.

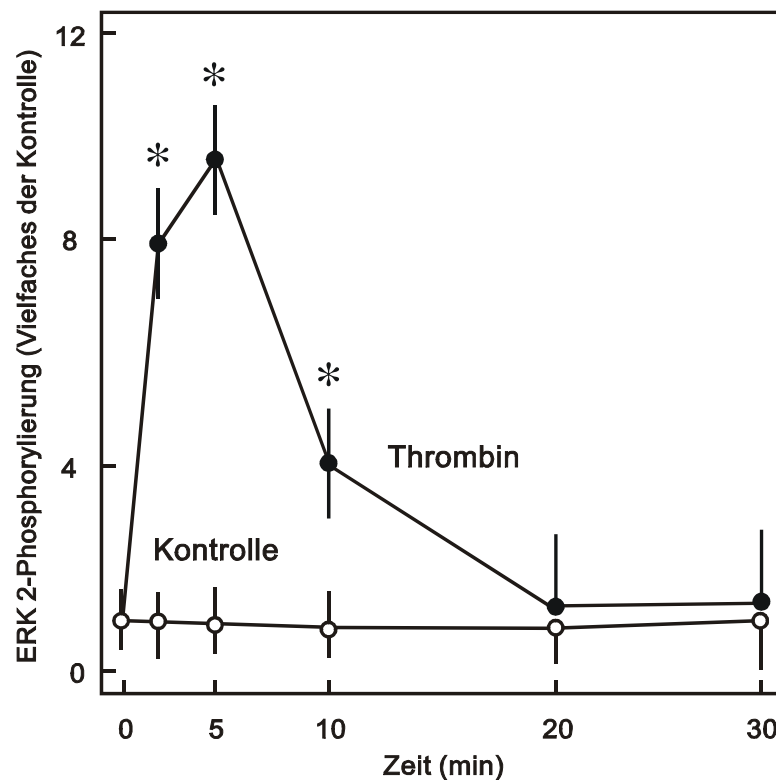
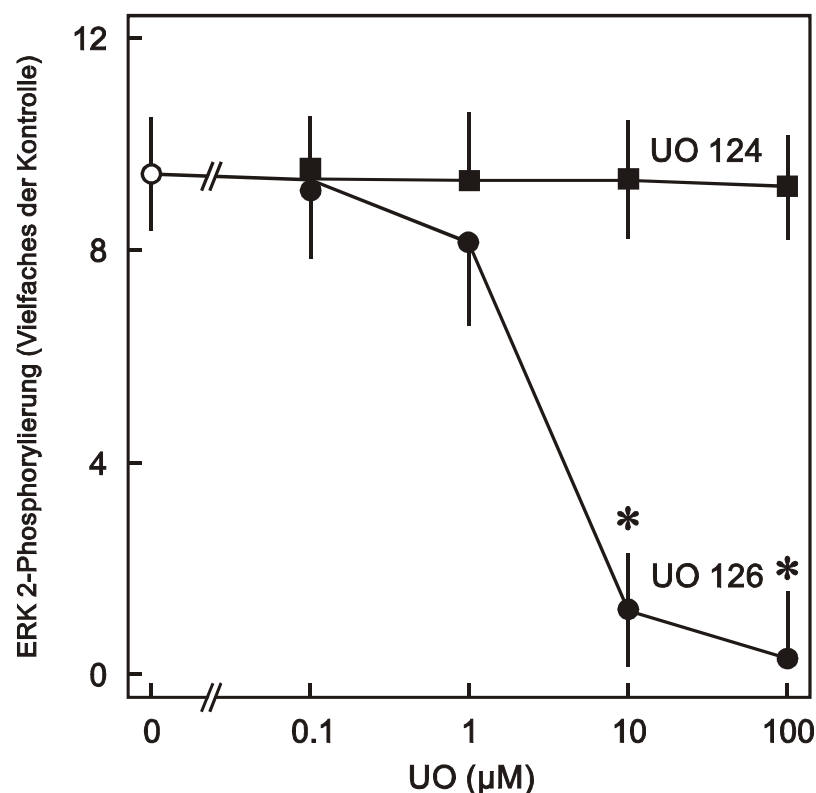


Abb. 4: Zeitverlauf der ERK 2-Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulation (0,2 U/ml Thrombin). Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; * $P<0,05$ gegenüber Kontrolle.

Hemmung des ERK 2-Signalweges mit UO 126

UO 126 ist ein spezifischer Inhibitor der MEK1/2, die wiederum ERK 1 und 2 phosphorylieren. Durch Einsatz dieses Inhibitors ließ sich die Thrombin-induzierte Aktivierung von ERK 2 verhindern (Abb. 5). UO 126 hemmte konzentrationsabhängig die Thrombin-induzierte ERK 2-Phosphorylierung. Dabei reduzierte es die ERK 2-Phosphorylierung von einem Wert, der dem 10-fachen der Kontrolle entspricht, auf Kontrollniveau. Die maximale Hemmung trat bereits bei einer Konzentration von 10 μM auf. UO 124, ein inaktives UO 126-Analogon, zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich keine Wirkung. Eine unspezifische Wirkung der Substanzklasse ist daher ausgeschlossen. Für alle folgenden Experimente wurde UO 126 in der maximalen Hemmkonzentration von 10 μM eingesetzt.



*Abb. 5: Konzentrationsabhängige Wirkung von UO 126, einem MEK1/2-Hemmstoff, auf die Thrombin-induzierte ERK 2-Phosphorylierung. UO 124, ein inaktives Analogon, wurde als Kontrolle verwandt. Die HUVEC wurden für 5 min in Gegenwart von 0,2 U/ml Thrombin und den UO-Analoga inkubiert. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; * $P<0,05$ gegenüber UO 124.*

3.3 Hemmung von MEK 1/2 stabilisiert die endotheliale Schranke

UO 126 verringert die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität

Um zu überprüfen, ob die Hemmung von MEK 1/2 die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität beeinflusst, wurden die Endothelzellen unter identischen Bedingungen wie in Abb. 2, jedoch in Gegenwart von UO 126 inkubiert. Abb. 6 zeigt, dass die Hemmung des MEK 1/2-Signalweges durch 10 μ M UO 126 die Thrombin-induzierte Steigerung der Permeabilität um fast die Hälfte, von 13 auf 7×10^{-6} cm/s verringert. UO 126 alleine hatte keine Wirkung auf die Permeabilität.

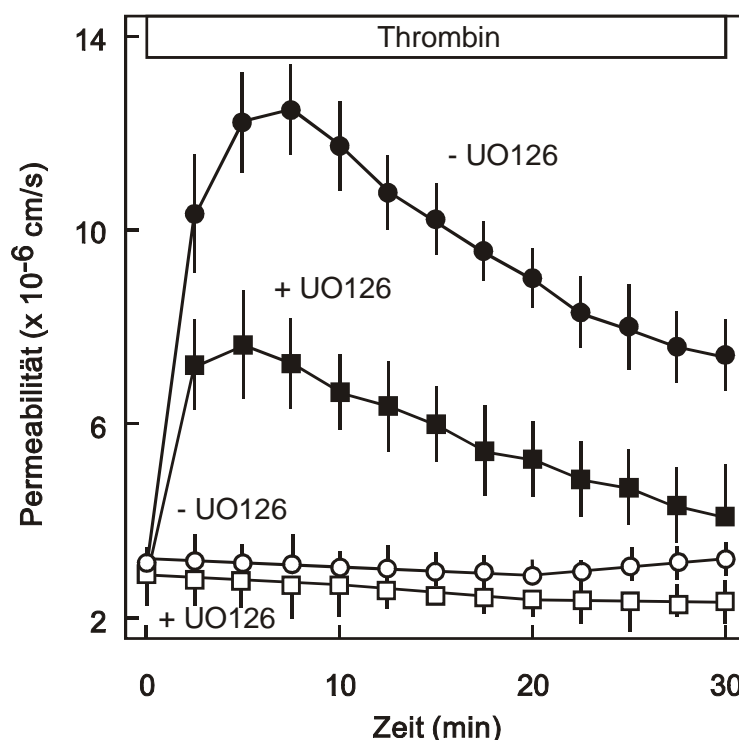


Abb.6: Wirkung von UO 126, einem MEK 1/2-Hemmstoff, auf die Permeabilität. HUVEC wurden mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert (●, -UO 126). Diese Permeabilitätsdaten entsprechen denen in Abb. 2. Ein Teil der Zellen wurde hier für 30 Minuten mit 10 μ M UO 126 vorinkubiert und anschließend Thrombin ausgesetzt (■, +UO 126). (○, -UO 126) unbehandelte Kontrollen; (□, +UO 126) UO 126 alleine. Mittelwerte \pm S.D.; $n=4$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; zu den Zeitpunkten zwischen 2,5 und 30 Minuten ist die Permeabilität in Anwesenheit von Thrombin oder Thrombin plus UO 126 signifikant verschieden ($P<0,05$).

UO 126 verringert die Thrombin-induzierte Kontraktion

Thrombin verursacht in Monolayern aus kultivierten Endothelzellen eine Aktivierung des kontraktile Apparates, die zu einer messbaren Erhöhung der isometrischen Kraft führt. Die unter Kontrollbedingungen herrschende isometrische Kraft von ca. 150 μN wurde nach Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin auf ca. 235 μN gesteigert. Dieser Anstieg der isometrischen Kraft hatte sein Maximum nach etwa 10 min und fiel daraufhin wieder steil ab. Das Kontrollniveau wurde jedoch nicht mehr erreicht. Hemmung des MEK 1/2-Signalweges mit 10 μM UO 126 verminderte diesen Anstieg um etwa ein Drittel auf ca. 200 μN . UO 126 alleine hatte keine Wirkung auf die Kraftentwicklung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nicht dargestellt).

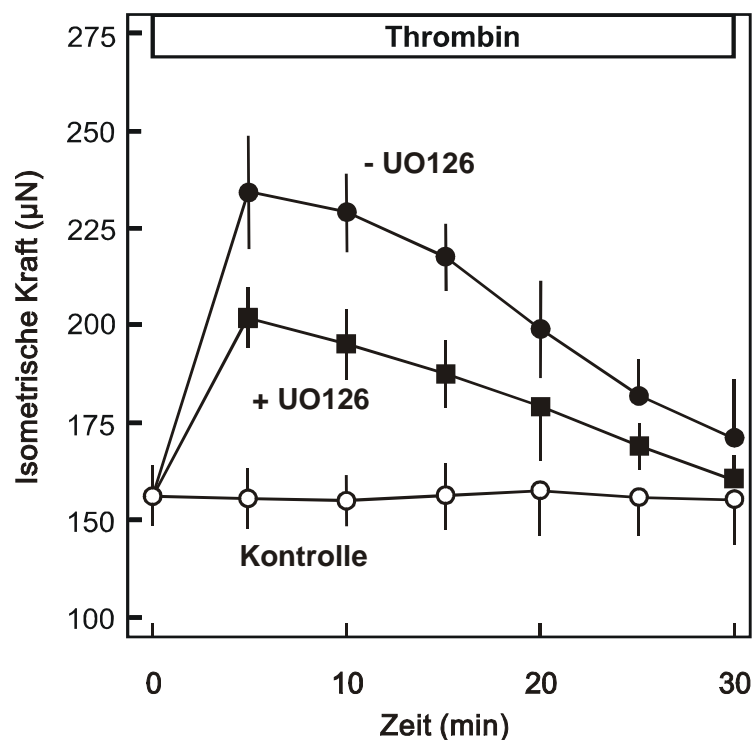


Abb. 7: Wirkung von UO 126, einem MEK 1/2-Hemmstoff, auf die isometrische Kraft. HUVEC wurden mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert (-UO 126). Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit 10 μM UO126 vorinkubiert (+UO 126). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 Minuten ist die isometrische Kraft in Anwesenheit von Thrombin und Thrombin plus UO 126 signifikant verschieden ($P<0,05$).

UO 126 verringert die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MLC

Der Beginn einer Kontraktion von Endothelzellen und die damit einhergehende Steigerung der Permeabilität wird durch eine Zunahme der MLC-Phosphorylierung verursacht. Durch elektrophoretische Trennung der phosphorylierten von der nicht-phosphorylierten Form der MLC lässt sich der Phosphorylierungsstatus bestimmen. Stimulation der Endothelzellen mit 0,2 U/ml Thrombin führte innerhalb von etwa 5 min zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung von ca. 75% unter Kontrollbedingungen auf ca. 180%. Durch 10 μ M UO 126 wurde dieser durch Thrombin induzierte Anstieg der MLC-Phosphorylierung auf ca. 120% vermindert. UO 126 alleine hatte keine Wirkung auf die MLC-Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nicht dargestellt).

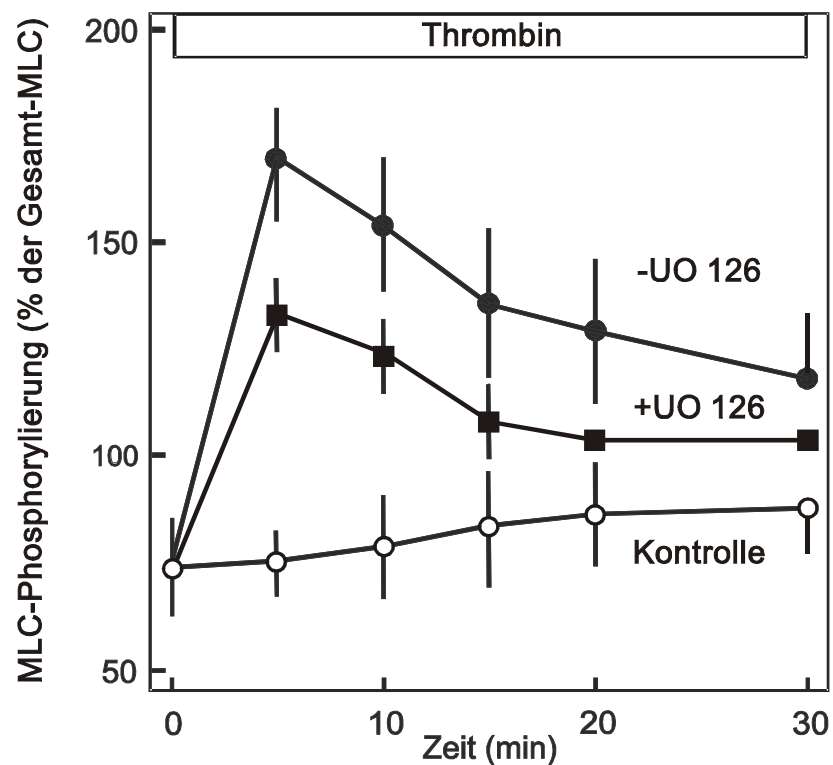


Abb. 8: Wirkung von UO 126 auf die MLC-Phosphorylierung. HUVEC wurden mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert (-UO 126). Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit 10 μ M UO126 vorinkubiert (+UO 126). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 15 Minuten ist die MLC-Phosphorylierung in Anwesenheit von Thrombin und Thrombin plus UO 126 signifikant verschieden ($P<0,05$). Das Verhältnis von phosphorylierter zu nicht phosphorylierter MLC ist unabhängig von der Gesamtproteinmenge (s. Methoden).

3.4 Der Effekt von ERK auf den kontraktilen Apparat involviert MLCK

Wie oben beschrieben führt in Endothelzellen die Stimulation mit Thrombin zu einer Aktivierung des kontraktilen Apparates. Dabei wird unter anderem Rho-abhängig die MLCP gehemmt (15). Unter diesen Bedingungen ist für den Grad der MLC-Phosphorylierung die Aktivität der MLCK von entscheidender Bedeutung. Um zu analysieren, ob die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch Thrombin Einfluss auf die MLCK oder MLCP hat, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurden verschiedene Elemente der Regulation der MLCP untersucht.

Hemmung der Rho-Kinase hat keinen Effekt auf die Aktivierung von ERK

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ERK 1/2 durch die Rho-Kinase aktiviert werden kann (19, 39). Zudem ist die Rho-Kinase ein wichtiges Signalelement in der Thrombin-induzierten Hemmung der MLCP (15, 25). Um zu prüfen ob ERK 1/2 in Endothelzellen durch die Rho-Kinase aktiviert wird und über diesen Mechanismus die MLCP hemmt, wurde zunächst der selektive Hemmstoff der Rho- Kinase Y-27632 eingesetzt.

Bei nicht stimulierten Zellen ließ sich durch Gabe von 10 µM Y-27632 keine Änderung der ERK 2-Phosphorylierung feststellen (Abb. 9). Bei Zellen, die mit Thrombin stimuliert wurden, ließ sich durch Gabe von 10 µM Y-27632 ebenfalls keine Änderung der Phosphorylierung von ERK 2 messen. Diese Befunde legen nahe, dass die Aktivierung des ERK-Signalweges durch Thrombin nicht über Rho-abhängige Kinasen vermittelt wird.

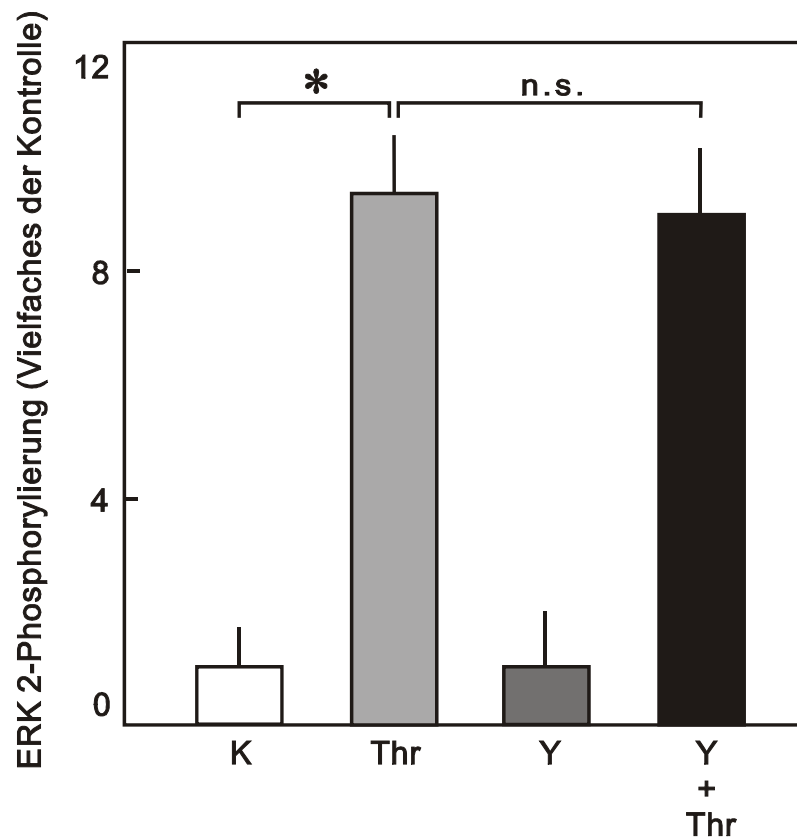


Abb. 9: Wirkung von Thrombin oder Y 27632, einem Rho-Kinase-Hemmstoff, auf die ERK 2-Phosphorylierung. HUVEC wurden für 5 Minuten mit 0,2 U/ml Thrombin (Thr), 10 μ M Y 27632 (Y) oder beiden Substanzen gleichzeitig inkubiert. K, Kontrolle. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; $*P<0,05$. n.s.: nicht signifikant verschieden.

ERK hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von MYPT

Als ein weiteres Element der MLCP-Regulation wurde die Phosphorylierung von MYPT untersucht. Stimulation mit Thrombin führt hier zu einer Rho-Kinase-abhängigen Phosphorylierung an Threonin 850 und Threonin 696. Ob ERK direkt MYPT phosphoryliert, wurde mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 10). Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin führt zu einer deutlichen Phosphorylierung an Threonin 850 sowie Threonin 696. Durch Einsatz von 10 μ M Y-27632 lässt sich diese Phosphorylierung verhindern, was zeigt, dass dieser Prozess Rho-Kinase-abhängig ist. Als

Positivkontrolle wurde Calyculin A verwendet, ein panspezifischer Hemmstoff der Phosphatasen, was zu einer maximalen Phosphorylierung von MYPT führte.

Hemmung von MEK 1/2 durch 10 μ M UO 126 führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Änderung des Phosphorylierungsstatus von MYPT. Auch kann die Thrombin-induzierte Phosphorylierung von MYPT durch Hemmung von MEK 1/2 nicht verhindert werden. Auf Ebene von MYPT findet also ebenfalls keine Beeinflussung der MLCP durch ERK 1/2 statt.

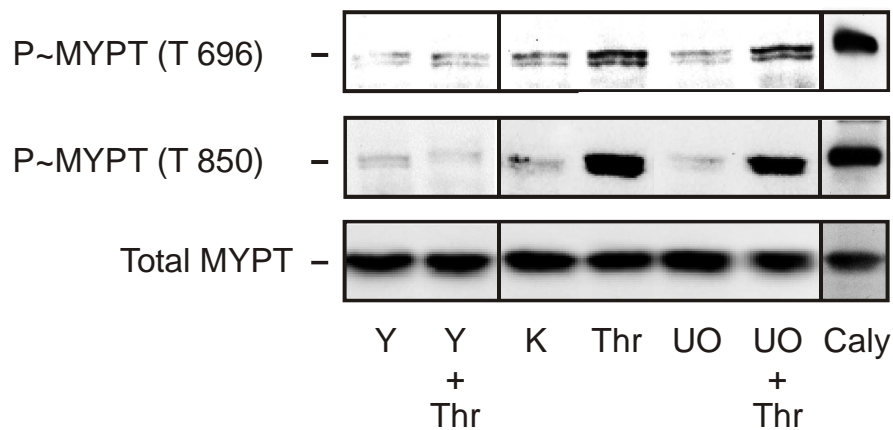


Abb. 10: Wirkung von Thrombin, UO 126, Y-27632 und Calyculin A auf die Phosphorylierung von MYPT. Repräsentative Westernblots zeigen die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung von MYPT (P~MYPT) an Threonin 696 (T 696) und Threonin 850 (T 850) sowie die Gesamtproteinmenge von MYPT (Total-MYPT). Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit 10 μ M Y-2763 (Y) oder 10 μ M UO 126 (UO) vorinkubiert. Die Stimulation erfolgte mit 0,2 U/ml Thrombin (Thr) für 5 Minuten. Die Stimulation mit Calyculin A (Caly) erfolgte mit einer Konzentration von 10 nM für 30 Minuten. K, Kontrolle.

Der ERK-Effekt auf die MLC-Phosphorylierung ist MLCP unabhängig

In einem weiteren Schritt wurde nun die MLCP pharmakologisch gehemmt, um zu überprüfen, ob der ERK-Effekt auf die MLC-Phosphorylierung durch die MLCP vermittelt wird. Um die Phosphatasen vollständig zu hemmen, wurde zusätzlich zu Thrombin der panspezifische Hemmstoff Calyculin A eingesetzt. Die Inkubation der Zellen für 30 min in Gegenwart von 10 nM Calyculin A steigerte die MLC-Phosphorylierung von 75% Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen auf 150% (Abb. 11). Bei gleichzeitiger Zugabe von Calyculin A und Thrombin wird die MLC-Phosphorylierung sogar noch weiter auf 170% im gleichen Zeitraum gesteigert. Die Steigerung der MLC-Phosphorylierung deutet darauf hin, dass die MLCK unter diesem Manöver weiterhin an der Netto-Phosphorylierung beteiligt ist und dass deren Aktivität durch Thrombin gesteigert ist. Die gleichzeitige Hemmung von MEK 1/2 mit 10 μ M UO 126 reduziert die Thrombin-induzierte MLC-Phosphorylierung von 170% auf ca. 80% im gleichen Zeitraum.

Diese Reduzierung der MLC-Phosphorylierung deutet darauf hin, dass Hemmung des ERK 1/2-Signalweges die Netto-Phosphorylierung der MLC über den Kinaseweg beeinflusst während der Phosphataseweg nicht beteiligt ist. Deshalb wurde im Folgenden überprüft, ob der Effekt des ERK 1/2-Signalweges auf den kontraktilen Apparat durch eine Aktivierung der MLCK vermittelt wird.

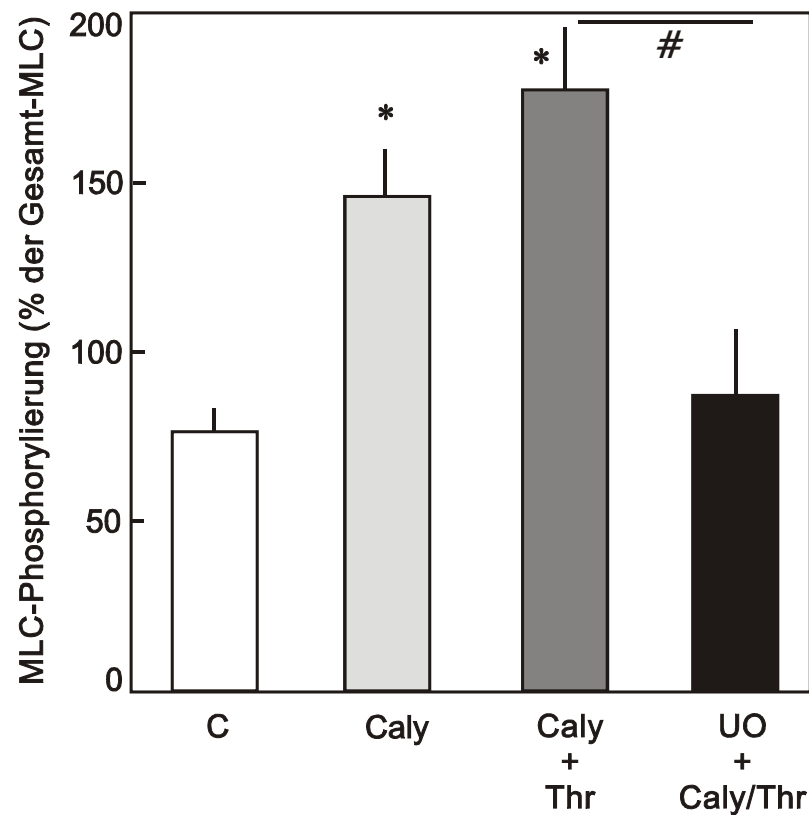


Abb. 11: Wirkung von Thrombin, Calyculin A, einem panspezifischen Phosphatase-Hemmstoff und UO 126, einem MEK 1/2-Hemmstoff, auf die MLC-Phosphorylierung. HUVEC wurden entweder mit 10 nM Calyculin A (Caly) oder 10 nM Calyculin A plus 10 μ M UO 126 (UO) für 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte für 5 Minuten die Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin (Thr). Mittelwerte \pm S.D.; $n=6$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; * $P<0,05$ gegenüber Kontrolle, # $P<0,05$.

Thrombin-vermittelte MLC-Phosphorylierung ist MLCK abhängig

Um die Rolle der MLCK in der Thrombin-vermittelten Aktivierung des kontraktile Apparates zu demonstrieren, wurde der spezifische MLCK-Hemmstoff ML-7 eingesetzt. Einsatz von 10 μ M ML-7 reduziert die MLC-Phosphorylierung von etwa 70% unter Kontrollbedingungen auf etwa 10% (Abb. 12). Die durch Thrombin induzierte Zunahme auf ca. 175% kann vollständig verhindert werden. Dieses Experiment zeigt, dass die MLCK essentiell ist für die Thrombin-induzierte MLC-Phosphorylierung.

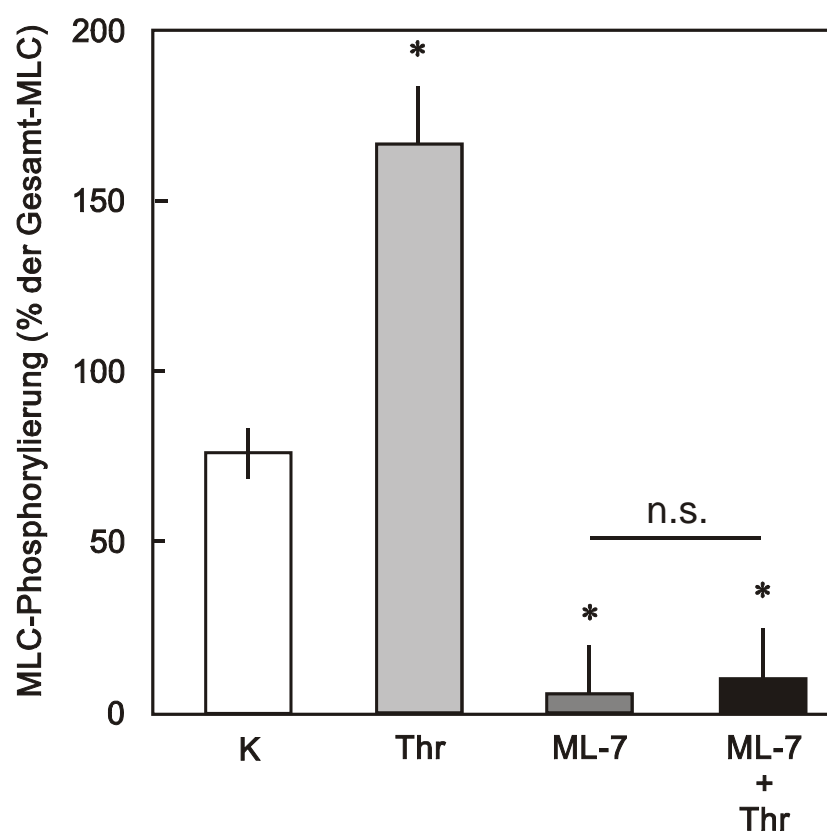


Abb. 12: Wirkung von Thrombin ML-7, einem MLCK-Hemmstoff, auf die MLC-Phosphorylierung. Ein Teil der HUVEC wurde für 30 Minuten mit 10 μ M ML-7 vorinkubiert (ML-7), anschließend wurden sie mit 0,2 U/ml Thrombin (Thr) für 5 Minuten stimuliert. K, Kontrolle. Mittelwerte \pm S.D.; $n=5$ Experimente unabhängiger Zellpreparationen; * $P<0,05$ gegenüber Kontrolle. n.s.: nicht signifikant verschieden.

Der ERK-Effekt auf die MLC-Phosphorylierung wird über MLCK vermittelt

In einem weiteren Schritt wurde die Aktivität der MLCK direkt bestimmt (Abb. 13). Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin führte zu einer Steigerung der MLCK-Aktivität auf 160% der Kontrolle. Der spezifische MLCK-Hemmstoff ML-7 senkte in einer Konzentration von 10 μ M die Aktivität unter das Basalniveau ab. Dies zeigt, dass die MLCK auch in nicht stimulierten HUVEC bereits aktiv ist. Ebenso ließ sich die durch Thrombin-induzierte Aktivierung mit ML-7 fast vollständig verhindern. Der Einsatz des MEK 1/2-Inhibitors UO 126 verursacht keine signifikante Änderung der MLCK-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig mit Thrombin gegeben verhinderte UO 126 jedoch die Thrombin-induzierte Aktivitätssteigerung der MLCK fast vollständig. Dies zeigt, dass ERK1/2 in unstimulierten HUVEC die MLCK-Aktivität nicht beeinflussen. Die Aktivierung von ERK1/2 durch Thrombin führt jedoch zu einer Steigerung der MLCK-Aktivität.

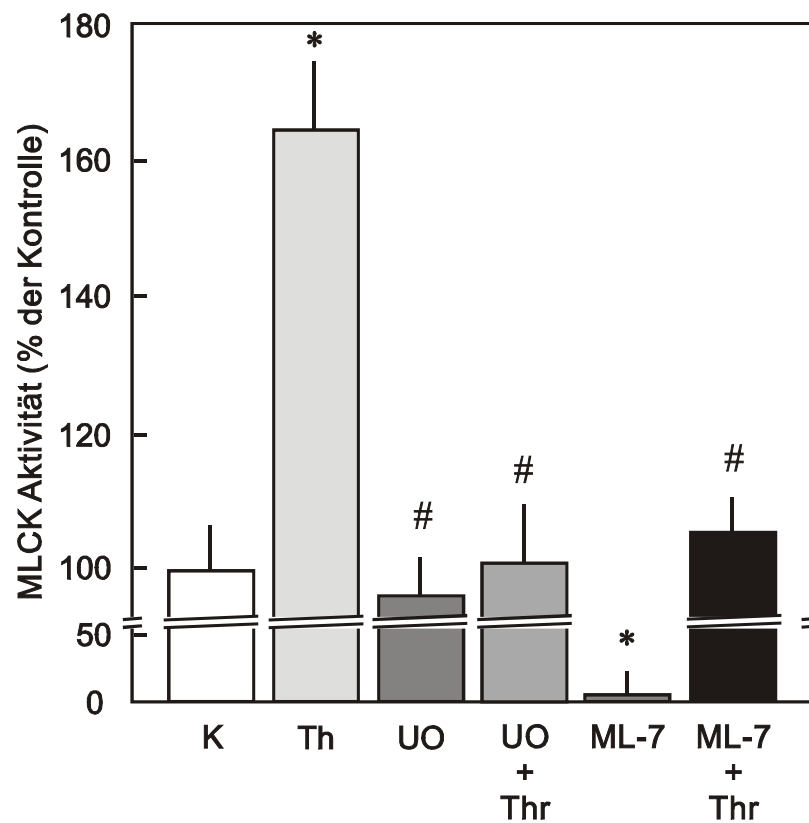


Abb. 13: Wirkung von Thrombin, UO 126, einem MEK 1/2-Hemmstoff und ML-7, einem MLCK-Hemmstoff, auf die MLCK-Aktivität. Ein Teil der HUVEC wurde für 30 Minuten mit 10 μ M UO 126 (UO) oder 10 μ M ML-7 (ML-7) vorinkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin (Thr) für 5 Minuten. K, Kontrolle. Mittelwerte \pm S.D.; n=5 Experimente unabhängiger Zellpreparationen; * $P < 0,05$ gegenüber Kontrolle; # $P < 0,05$ gegenüber Thrombin.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Mechanismen zu identifizieren, die im inflammatorischen Krankheitsgeschehen Einfluss auf den kontraktilen Apparat von Endothelzellen nehmen und so zu einem endothelialen Schrankenversagen mit konsekutiver Ödembildung führen. Im Zentrum der Untersuchungen stehen die *extracellular-signal-regulated-kinase 1/2*.

Der Hauptbefund dieser Arbeit ist, dass ERK 1/2 ein neues regulatorisches Signalelement des endothelialen kontraktilen Apparates ist, das (i) durch Thrombin aktiviert werden, (ii) das MLCK - unabhängig von der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration - aktiviert und (iii) dadurch ganz wesentlich zum funktionellen Versagen der endothelialen Barriere beiträgt. Damit ist für die MLCK erstmals ein zu Ca^{2+} /Calmodulin alternativer Aktivierungsweg nachgewiesen.

4.1 Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität ist nicht allein durch Unterdrückung des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs hemmbar

Stimulation mit Thrombin führt zu einer Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, was zu einer Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen MLCK führt (59). Dies ist die Ursache für die Aktivierung des kontraktilen Apparates der Endothelzellen und bewirkt bei gleichzeitiger Lösung der Zell-Zell-Kontakte das Schrankenversagen (22). Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dass die Hemmung des IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzungskanals des endoplasmatischen Retikulums durch Xestospongin C wohl den Thrombin-induzierten Ca^{2+} -Anstieg fast vollständig senkt, jedoch keinesfalls ausreichte, um die Hyperpermeabilität zu verhindern. Dies legt die Annahme nahe, dass andere Ca^{2+} -unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des kontraktilen Apparates spielen. Aus Arbeiten der eigenen Gruppe (37) gab es zudem Hinweise, dass ERK 1/2 die MLC-Phosphorylierung beeinflusst.

4.2 Einsatz von ERK-Hemmstoffen stabilisiert die endotheliale Barriere

Dass die Aktivierung von ERK 1/2 nicht nur bei der Zellproliferation und bei Wachstumsprozessen eine Rolle spielen, ist vielfach belegt. Auch in inflammatorischen Prozessen sind ERK 1/2 beteiligt. Eine Aktivierung von ERK konnte in Endothelzellen verschiedener Spezies oder Gefäßprovinzen nach einer Stimulation mit Oxidantien (34), Histamin (70), VEGF (35) und Thrombin (7) beobachtet werden. In unserem Modell konnte über Phosphorylierung eine Aktivitätssteigerung von ERK 1/2 durch den prokoagulatorischen und -inflammatorischen Mediator Thrombin in HUVEC nachgewiesen werden.

Als Folge einer Aktivierung von ERK 1/2 wurde eine Umverteilung von Zelladhäsionsproteinen beschrieben, die zur Störung der Barrierefunktion führte (35). Auch kommt es zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts und einer vermehrten Phosphorylierung von Caldesmon (7). Eine Änderung des Phosphorylierungsgrades der regulatorischen Myosinleichtkette durch Hemmung von ERK 1/2 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Autoren der zitierten Arbeit gingen deswegen von einer MLCK-unabhängigen Regulation der Barrierefunktion durch ERK 1/2 aus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in HUVEC eine ERK 1/2 Phosphorylierung direkt zu einer Aktivierung des kontraktile Apparates im Sinne einer Phosphorylierung der MLC mit konsekutivem Anstieg der isometrischen Kraft führt. Gleichzeitig konnte als Ausdruck des endothelialen Schrankenversagens eine gesteigerte Permeabilität gemessen werden. Durch Einsatz eines spezifischen ERK 1/2-Hemmstoffes konnte die Thrombin-induzierte Hyperpermeabilität um fast die Hälfte reduziert werden, was die Bedeutung von ERK 1/2 in der Regulation der endothelialen Barriere belegt.

4.3 Phosphatasen sind an dem Effekt von ERK1/2 nicht beteiligt

Die Phosphorylierung der regulatorischen MLC ist Voraussetzung für die Aktivierung des kontraktile Apparates (22). Das Ausmaß der Phosphorylierung wird von der Aktivität zweier Enzyme bestimmt: der MLCK und der MLCP. Ein gut untersuchter Mechanismus über den die Phosphorylierung der MLC gesteigert und so eine Kontraktion hervorgerufen wird, ist die Rho-abhängige Hemmung der MLCP (15, 60). Stimulation mit Thrombin führt zu einer Aktivierung der Rho-Kinase (15, 25), die über eine Phosphorylierung von MYPT die Phosphatasen hemmt (4, 63). Verschiedene Autoren konnten zudem eine Beteiligung von Rho-Kinasen an der Regulation der ERK 1/2-Aktivität nachweisen (19, 39).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass in HUVEC die Thrombin-induzierte ERK-Aktivierung nicht von Rho-Kinasen abhängig ist. Die Steigerung der Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit Thrombin lässt sich durch Einsatz von spezifischen Rho-Kinase-Hemmstoffen nicht verhindern. Auch eine Wirkung unterhalb der Rho-Kinasen auf die MLCP konnte nicht nachgewiesen werden. Der Phosphorylierungsgrad von MYPT konnte durch Hemmung von ERK 1/2 nicht wesentlich beeinflusst werden.

Um die Wirkung des MEK/ERK-Signalweges auf die MLCP zu überprüfen, wurde eine maximale Hemmung der MLCP durch Einsatz von Thrombin in Kombination mit Calyculin A erreicht. Unter diesen Bedingungen ist auch die Phosphorylierung der MLC maximal. Durch gleichzeitige Hemmung von ERK kann unter dieser Bedingung keine weitere Hemmung der MLCP erreicht werden. Die beobachtete Reduktion der MLC-Phosphorylierung ist deshalb am ehesten auf eine Reduktion der Aktivität der MLCK zurückzuführen.

4.4 ERK aktiviert direkt die MLCK

Die MLCK ist für den kontraktile Apparat in Endothelzellen von entscheidender Bedeutung. Wird die MLCP gehemmt, so wie es nach Stimulation mit Thrombin der Fall ist, ist die MLCK für die Steigerung der MLC-Phosphorylierung verantwortlich. Inaktivierung der MLCK durch den spezifischen Inhibitor ML-7, verhindert die Thrombin-induzierte Steigerung

der MLC-Phosphorylierung. Es kann hierbei ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der MLCK, Phosphorylierung der MLC, Kontraktion der Endothelzellen und Anstieg der Permeabilität hergestellt werden (22, 71).

Die Aktivität der MLCK ist einerseits abhängig von einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Bildung eines Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes (26). Andererseits verfügt die MLCK über Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen (Proteinkinase A, Proteinkinase C, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, p21-aktivierte Proteinkinase), die die Aktivität modulieren (20, 21, 33). *In vitro* sind unter anderem auch Phosphorylierungsstellen für Prolin-gerichtete Kinasen (ERK) nachgewiesen worden (65). Hinweise für eine Aktivierung der MLCK durch ERK gibt es aus Experimenten mit Fibroblasten von Rattenembryonen und Karzinomzelllinien (11, 36). Eine daraus resultierend Umorganisation des Zytoskeletts und Membranfaltung ist hier für eine Zellmigration verantwortlich (11, 29).

Mit Hilfe des MLCK-Aktivitäts-Assays konnte erstmals in Endothelzellen eine Aktivierung der MLCK durch ERK 1/2 nachgewiesen werden. Der Befund, dass die MLCK direkt durch ERK 1/2 aktiviert wird, steht hierbei im Gegensatz zu der Beobachtung anderer Autoren, die zwar ebenfalls eine Beteiligung von ERK 1/2 in der durch Thrombin induzierten Hyperpermeabilität sehen, aber keine Änderung in der Phosphorylierung der MLC nachweisen konnten (7, 65, 67). Borbiev und Mitarbeiter (7) nehmen an, dass ERK 1/2 über eine Phosphorylierung von Caldesmon die Regulation der endothelialen Barriere beeinflusst, schließt aber eine Beteiligung der MLCK aus.

Eine Aktivierung des kontraktile Apparates durch ERK 1/2 im Sinne einer MLCK-Aktivierung könnte jedoch den bedeutenden Einfluss von ERK auf die Funktion der endothelialen Barriere erklären. Im Einklang mit dieser Annahme steht die in dieser Untersuchung gemessene Steigerung der isometrischen Kraft sowie der MLC-Phosphorylierung. Damit kann der MEK/ERK-Weg als neuer potenter Aktivator und Regulator des kontraktile Apparates in Endothelzellen angesehen werden.

Im inflammatorischen Krankheitsgeschehen wäre somit ein neuer Signalweg identifiziert, der als Schlüsselmechanismus bei endothelialen Prozessen angesehen werden kann, die das Aktinzytoskelett und den kontraktilen Apparat involvieren. Dabei ist ERK 1/2 sowohl an der Proliferation und Differenzierung als auch an der Migration, Kontraktion und Schrankenfunktion der Endothelzellen beteiligt. Signalwege, die über Zytokine und Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wirken, sowie eine inflammatorische Aktivierung der Endothelzellen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden hier eine gemeinsame Endstrecke. Das Verständnis von ERK 1/2 als Verbindung zwischen diesen verschiedenen Einflüssen, denen Endothelzellen ausgesetzt sind, ist für vielfältige pathophysiologische Prozesse wie z.B. Ödementwicklung, Sepsis, Wundheilungsstörungen, Ischämie-Reperfusionsschaden und Angiogenese von entscheidender Bedeutung.

5 Zusammenfassung

Das Versagen der endothelialen Schranke im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens ist klinisch eine entscheidende Komplikation und bestimmt den Erfolg der therapeutischen Intervention. Therapeutische Strategien, die direkt an den Endothelzellen angreifen, sind zur Zeit nicht verfügbar. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Mechanismen zu identifizieren, die an der Entwicklung des *capillary leakage syndrome* maßgeblich beteiligt sind.

Es wurde insbesondere der Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf den kontraktilen Apparat der Endothelzellen untersucht, dem eine zentrale Rolle beim inflammatorischen Schrankenversagen zukommt. Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurden mit Thrombin als Modellsubstanz für einen proinflammatorischen Mediator stimuliert. UO 126, ein Hemmstoff der Signalkinase MEK oberhalb von ERK 1/2, bewirkte eine Abnahme der Thrombin-induzierten Hyperpermeabilität. Ebenso konnte die Phosphorylierung der regulatorischen Myosinleichtkette (MLC) und die Steigerung der isometrischen Kraftentwicklung der Endothelzellschichten nach Stimulation mit Thrombin durch UO 126 antagonisiert werden. Um die zugrundeliegenden Mechanismen der MEK/ERK-vermittelten kontraktilen Aktivierung näher zu charakterisieren wurden die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) sowie die Myosinleichtketten-Phosphatase (MLCP) als wesentliche regulatorische Proteine des endothelialen kontraktilen Apparates untersucht. Die Beteiligung der MLCP an der ERK-vermittelten Aktivierung des kontraktilen Apparates konnte durch Experimente mit einem pharmakologischen Hemmstoff (Calyculin A) sowie durch die direkte Analyse der Phosphorylierung der regulatorischen MLCP-Untereinheit MYPT weitgehend ausgeschlossen werden. Die direkte Bestimmung der MLCK-Aktivität bestätigte, dass Thrombin über Stimulation des MEK/ERK-Signalweges die Aktivität der MLCK steigert. Dieser Aktivierungsschritt ist unabhängig von der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass MEK/ERK als ein neuer Signalweg verstanden werden kann, der maßgeblich an der Regulation des kontraktile Apparates und damit der endothelialen Schrankenfunktion beteiligt ist. Die Tatsache, dass inflammatorische Mediatoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen eine endotheliale Hyperpermeabilität auslösen, alle MEK/ERK als einen gemeinsamen Signalweg aktivieren, zeigt eine neue therapeutische Option für die Protektion der endothelialen Schrankenfunktion auf.

6 Summary

During inflammatory disease endothelial barrier failure is a severe complication and determines the success of therapeutical intervention. At the moment there is no therapeutical strategy available which affects the endothelial barrier itself. Aim of this study was to identify mechanisms accountable for the development of capillary leakage syndrome.

In particular the influence of the MEK/ERK-signaling on the contractile apparatus of endothelial cells was analysed, which has major impact on the integrity of endothelial barrier function during inflammatory disease. Human endothelial cells obtained from umbilical veins were stimulated with thrombin as an inflammatory mediator. UO 126, an upstream inhibitor of MEK/ERK-signaling was able to reduce thrombin induced hyperpermeability. Concomitant the phosphorylation of the regulatory myosin light chain (MLC) and development of isometric force in endothelial cell monolayers after stimulation with thrombin could also be antagonized by use of UO 126. To further characterize the underlying mechanisms of MEK/ERK induced activation of the contractile apparatus the Ca^{2+} /Calmodulin dependent myosin light chain kinase (MLCK) and the myosin phosphatase (MLCP) were analysed, which are the most important regulatory proteins in the contractile apparatus of endothelial cells. Involvement of the MLCP in ERK mediated activation of the contractile apparatus of endothelial cells could be ruled out in experiments using a pharmacological inhibitor (calyculin A) and by measuring the phosphorylation of the regulatory subunit (MYPT) of MLCP. Direct quantification of the activity of the MLCK confirmed that thrombin augments MLCK activity via ERK 1/2 signaling. This activation is independent of cytosolic Ca^{2+} -concentration.

In conclusion, MEK/ERK is a novel signaling pathway playing a major role in regulating the contractile apparatus of endothelial cells and endothelial barrier function. The fact, that under different pathophysiological conditions accompanied by endothelial hyperpermeability, inflammatory mediators, cytokines and growth factors use MEK/ERK signaling as a common pathway, reveals new therapeutic options for the protection of the endothelial barrier.

7 Literaturverzeichnis

1. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD.** *Molecular Biology of the Cell*: Wiley VCH, 2000.
2. **Becker CG and Nachman RL.** Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle. *Am J Pathol* 71: 1-22, 1973.
3. **Birukova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JG, and Verin AD.** MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L75-84, 2005.
4. **Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, and Verin AD.** Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res* 67: 64-77, 2004.
5. **Blue EK, Goeckeler ZM, Jin Y, Hou L, Dixon SA, Herring BP, Wysolmerski RB, and Gallagher PJ.** 220- and 130-kDa MLCKs have distinct tissue distributions and intracellular localization patterns. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C451-460, 2002.
6. **Bogatcheva NV, Dudek SM, Garcia JG, and Verin AD.** Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *J Investig Med* 51: 341-352, 2003.
7. **Borbiev T, Verin AD, Birukova A, Liu F, Crow MT, and Garcia JG.** Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L43-54, 2003.
8. **Brahmbhatt AA and Klemke RL.** ERK and RhoA differentially regulate pseudopodia growth and retraction during chemotaxis. *J Biol Chem* 278: 13016-13025, 2003.
9. **Brutsaert DL and Herman AG.** The endothelium and cardiocirculatory function, Part I. Introduction. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 207-208, 1996.
10. **Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, and Cobb MH.** MAP kinases. *Chem Rev* 101: 2449-2476, 2001.

11. **Cheresh DA, Leng J, and Klemke RL.** Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J Cell Biol* 146: 1107-1116, 1999.
12. **Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, and Stern DM.** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561, 1998.
13. **D'Angelo G and Adam LP.** Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H602-610, 2002.
14. **Drexler H.** *Endothelfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen:* unimed, 2000.
15. **Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, and Aepfelbacher M.** Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 21867-21874, 1998.
16. **Fincham VJ, James M, Frame MC, and Winder SJ.** Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* 19: 2911-2923, 2000.
17. **Folkman J.** Angiogenesis. In: *Biology of Endothelial Cells*, edited by Simiunescu N, 1984.
18. **Furchgott RF and Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
19. **Gallagher ED, Gutowski S, Sternweis PC, and Cobb MH.** RhoA Binds to the Amino Terminus of MEKK1 and Regulates Its Kinase Activity. *J Biol Chem* 279: 1872-1877, 2004.
20. **Gallagher PJ, Herring BP, and Stull JT.** Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil* 18: 1-16, 1997.
21. **Goeckeler ZM, Masaracchia RA, Zeng Q, Chew TL, Gallagher P, and Wysolmerski RB.** Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* 275: 18366-18374, 2000.

22. **Goeckeler ZM and Wysolmerski RB.** Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 130: 613-627, 1995.
23. **Goeckeler ZM and Wysolmerski RB.** Myosin phosphatase and cofilin mediate cAMP/cAMP-dependent protein kinase-induced decline in endothelial cell isometric tension and myosin II regulatory light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 280: 33083-33095, 2005.
24. **Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.
25. **Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, and Noll T.** ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovascular Research* 59: 470-478, 2003.
26. **Gusev NB.** Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc)* 66: 1112-1121, 2001.
27. **Hartshorne DJ, Ito M, and Erdodi F.** Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 325-341, 1998.
28. **Hirano M, Niino N, Hirano K, Nishimura J, Hartshorne DJ, and Kanaide H.** Expression, subcellular localization, and cloning of the 130-kDa regulatory subunit of myosin phosphatase in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 490-496, 1999.
29. **Huang C, Jacobson K, and Schaller MD.** MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628, 2004.
30. **Ikeda M, Takei T, Mills I, Kito H, and Sumpio BE.** Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Am J Physiol* 276: H614-622, 1999.
31. **Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, and McDonald JM.** Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun

- kinase in endothelial cells. Gi2- and G beta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 272: 1395-1401, 1997.
32. **Johnson GL and Lapadat R.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912, 2002.
 33. **Kamm KE and Stull JT.** Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276: 4527-4530, 2001.
 34. **Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, and Alexander JS.** H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C21-30, 2000.
 35. **Kevil CG, Payne DK, Mire E, and Alexander JS.** Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273: 15099-15103, 1998.
 36. **Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, and Cheresh DA.** Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137: 481-492, 1997.
 37. **Klingenberg D, Gündüz D, Härtel F, Bindewald K, Schäfer M, Piper HM, and Noll T.** MEK/MAPK as a signaling element in ATP control of endothelial myosin light chain. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C807-812, 2004.
 38. **Kyriakis JM and Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
 39. **Laboureau J, Dubertret L, Lebreton-De Coster C, and Coulomb B.** ERK activation by mechanical strain is regulated by the small G proteins rac-1 and rhoA. *Experimental Dermatology* 13: 70-77, 2004.
 40. **Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, and Duran WN.** VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res* 62: 252-262, 2001.

41. **Levick J.** *Solute transport between blood and tissue*. New York: Butterworths, 1991.
42. **Lodish, Berk, Zipurski, Matsudaira, Baltimore, and Darnell.** *Molecular Cell Biology*. New York: Freeman, 2000.
43. **Lum H and Malik AB.** Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267: L223-241, 1994.
44. **Lüscher TF and Barton M.** Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20: 11-3-10, 1997.
45. **Majno G, Gilmore V, and Leventhal M.** On the mechanism of vascular leakage caused by histaminetype mediators. A microscopic study in vivo. *Circ Res* 21: 833-847, 1967.
46. **Michel CC and Curry FE.** Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79: 703-761, 1999.
47. **Muranyi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, Erdodi F, Kiss E, Wu Y, and Hartshorne DJ.** Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J* 366: 211-216, 2002.
48. **Oeckler RA, Kaminski PM, and Wolin MS.** Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. *Circ Res* 92: 23-31, 2003.
49. **Oluwole BO, Mc MM, and Sumpio BE.** Endothelial cell control of vasomotor tone. *Ann Vasc Surg* 9: 293-301, 1995.
50. **Persechini A, Kamm KE, and Stull JT.** Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 261: 6293-6299, 1986.
51. **Peters S, Reis A, and Noll T.** *Preparation of Endothelial Cells from Micro- and Macrovascular Origin*. Berlin: Springer, 2005.
52. **Renkin E.** Transport Pathways and Processes. In: *Endothelial Cell Biology in Health and Disease*. New York Plenum Press, 1982.

53. **Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, and Nakano T.** Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 92: 411-418, 2003.
54. **Shepro D and D'Amore P.** Physiology and Biochemistry of the Vascular Wall Endothelium. In: *Handbook of Physiology: Section 2: The Cardiovascular System Volume IV, Parts 1 & 2: Microcirculation (Handbook of Physiology Revised Edition)* edited by Renkin EM and Michel CC: An American Physiological Society Book, 1984.
55. **Simionescu M and Simionescu N.** Endothelial Cell Biology in Health and Disease. New York: plenum press, 1988.
56. **Sobue K and Sellers JR.** Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. *J Biol Chem* 266: 12115-12118, 1991.
57. **Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, and Malik AB.** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-422, 2000.
58. **Sumpio BE, Yun S, Cordova AC, Haga M, Zhang J, Koh Y, and Madri JA.** MAPKs (ERK1/2, p38) and AKT can be phosphorylated by shear stress independently of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280: 11185-11191, 2005.
59. **Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, and Malik AB.** Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology* 39: 173-185, 2002.
60. **van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, and van Hinsbergh VW.** Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 87: 335-340, 2000.
61. **Vanhoutte PM and Mombouli JV.** Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 229-238, 1996.

62. **Varma S, Breslin JW, Lal BK, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, and Duran WN.** p42/44MAPK regulates baseline permeability and cGMP-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Microvasc Res* 63: 172-178, 2002.
63. **Velasco G, Armstrong C, Morrice N, Frame S, and Cohen P.** Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett* 527: 101-104, 2002.
64. **Verin AD, Csontos C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang P, Patterson CE, and Garcia JG.** Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: involvement in contractile responses. *J Cell Biochem* 79: 113-125, 2000.
65. **Verin AD, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, and Garcia JG.** Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 767-776, 1998.
66. **Verin AD, Lazar V, Torry RJ, Labarrere CA, Patterson CE, and Garcia JG.** Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 758-766, 1998.
67. **Verin AD, Liu F, Bogatcheva N, Borbiev T, Hershenson MB, Wang P, and Garcia JG.** Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L360-370, 2000.
68. **Verin AD, Patterson CE, Day MA, and Garcia JG.** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am J Physiol* 269: L99-108, 1995.
69. **Verin AD, Wang P, and Garcia JG.** Immunochemical characterization of myosin-specific phosphatase 1 regulatory subunits in bovine endothelium. *J Cell Biochem* 76: 489-498, 2000.
70. **Wu MH, Yuan SY, and Granger HJ.** The protein kinase MEK1/2 mediate vascular endothelial growth factor- and histamine-induced hyperpermeability in porcine coronary venules. *J Physiol* 563: 95-104, 2005.

71. **Wysolmerski RB and Lagunoff D.** Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 16-20, 1990.
72. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, and Holash J.** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

8.2 Wissenschaftliche Publikationen

1. Bindewald K, Gündüz D, Härtel F, Peters SC, **Rodewald C**, Nau S, Schäfer M, Neumann J, Piper HM, and Noll T. Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. **Am J Physiol Cell Physiol** 287: C1246-1255, 2004.
2. Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, **Rodewald CW**, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, and Noll T. ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. **Cardiovasc Res** 59: 470-478, 2003.
3. Härtel FV, **Rodewald CW**, Aslam M, Gündüz D, Hafer L, Neumann J, Piper HM, and Noll T. Extracellular ATP induces assembly and activation of the myosin light chain phosphatase complex in endothelial cells. **Cardiovasc Res** 74: 487-496, 2007.
4. Aslam M, Härtel F, Arshad M, **Rodewald C**, Gündüz D, Piper H M, Noll T. cAMP/PKA stabilizes endothelial barrier function by activation of myosin light chain phosphatase: critical role of CPI-17 (**eingereicht**).

8.3 Veröffentlichte Kongressbeiträge

1. Härtel F, Muhammad A, **Rodewald C**, Gündüz D, Hafer L , Neumann J, Piper HM, Noll T. Extrazelluläres ATP stabilisiert die endotheliale Schrankenfunktion über Aktivierung des Myosinleichtkettenphosphatase-Komplexes. *71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung Mannheim, 31.März bis 02.April 2005*
2. **Rodewald C**, Härtel F, Peters S, Gündüz D, Noll T. Nitric Oxide Stabilizes Endothelial Barrier Function Via Activation of Myosin Light Chain Phosphatase. *Annual Meeting of the American Heart Association, New Orleans, 7. bis 10.November 2004*
2. Härtel F, **Rodewald C**, Gündüz D, Neumann J, Piper HM, Noll T. Extracellular ATP Antagonizes Thrombin-induced Hyperpermeability by Activation of Myosin-Light-Chain-Phosphatase. *Annual Meeting of the American Heart Association, New Orleans, 7. bis 10.November 2004*

4. Härtel F, **Rodewald C**, Gündüz D, Noll T. Extrazelluläres ATP hemmt den kontraktilen Apparat von Endothelzellen über Dephosphorylierung der regulatorischen und katalytischen Untereinheit der MLC-Phosphatase. *70.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung Mannheim, 15. bis 17. April 2004*
5. Härtel F, **Rodewald C**, Peters S, Gündüz D, Noll T. Gegensätzliche Wirkung von NO auf den kontraktilen Apparat und die endotheliale Schrankenfunktion. *Vortrag auf der 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung Mannheim, 15. bis 17. April 2004*
6. Härtel F, **Rodewald C**, Gündüz D, Hafer L, Neumann J, Noll T. Extracellular ATP protects endothelial barrier function by activation of myosin light chain phosphatase in human endothelial cells. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Leipzig 2004*
7. Gündüz D, **Rodewald C**, Härtel F, Peters S, Noll T Thrombin activates the contractile machinery and provokes loss of endothelial barrier property via p42/44 mitogen-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells.. *Annual Meeting of the American Heart Association, Orlando 2003.*
8. Härtel F, **Rodewald C**, Peters S, Gündüz D, Noll T. Opposing Effects of NO on Endothelial Cell barrier function. *Annual Meeting of the American Heart Association, Orlando 2003*

9. Gündüz D, Härtel F, **Rodewald C**, Peters S, Piper HM, Noll T. ATP antagonisiert das Thrombin-induzierte Schrankenversagen durch direkte Aktivierung von Phosphatasen in humanen Endothelzellen. 69. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung Mannheim, 24. bis 26. April 2003*
10. Gündüz D, Härtel F, **Rodewald C**, Peters S, Piper HM, Noll T. ATP antagonises thrombin-induced activation of the contractile machinery by direct activation of myosin light chain phosphatase in human endothelial cells. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Bochum, 2003*

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christoph Rodewald